



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549006_0076

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
(Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Brendel) an der Chirurgischen Klinik
(Direktor: Prof. Dr. G. Heberer) der Universität München

VERBESSERUNG DER ENTERALEN RESORPTION GROSSMOLEKULARER
FREMDPROTEINE BEI RATTEN UND IHRE BIOLOGISCHE
AUSWIRKUNG AUF HAUTTRANSPLANTATE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnmedizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Kristofer Leu

aus

München

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: P.D. Dr. J.Seifert

Mitberichterstatter: Prof. Dr.Dr.h.c. W.Brendel

Dekan: Prof. Dr. W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 3. 78



INHALTSANGABE

	Seite
1. Einleitung	1
2. Ziel der Arbeit	4
3. Material und Methoden:	6
3.1. Material	6
3.2. Isotopentechnische Meßverfahren	7
3.2.1. Radioaktive Markierung der oral zu appli- zierenden Fremdproteine (PGG) mit ^{131}J bzw. ^{125}J	7
3.2.2. Trennung von groß- und kleinmolekularen radio- aktiv markierten Proteinen nach der Methode der Radiochromatographie mit Sephadexgelen	9
3.2.3. Quantitative Bestimmung von radioaktiv mar- kiertem Protein nach dem Verfahren der Szin- tillationszählung für Gammastrahlen	11
3.2.4. Bestimmung der Organverteilung der aufgenommenen Fremdproteine	11
3.3. Immunologische Meßverfahren:	13
3.3.1. Prinzip der Doppeldiffusionsmethode im Agargel zum immunologischen Nachweis von resorbierten Proteinen in Blut und Lymphe bzw. von Antikörpern gegen oral appliziertes Pferdeprotein	13

	Seite
3.4. Biologische Testverfahren	15
3.4.1. Mechanische Unterbindung der sekretorischen Pankreasenzyme bei Ratten	15
3.4.2. Hauttransplantationstechnik	16
3.4.3. Beurteilung der Hauttransplantatabstoßung	17
3.5. Orale Applikation von Medikamenten	19
3.6. Versuchsgruppen	19
4. Ergebnisse	22
4.1. Enterale Resorption von oral verabreichten, markierten Proteinen	22
4.2. Nicht enteral resorbierte, markierte Proteine (d.h. Restaktivität) nach oraler Gabe	29
4.3. Verteilung der Radioaktivität in groß- und kleinemolekulare Fremdproteine nach der Darmwandpassage	35
4.4. Auswirkung auf die Eiweißverdauung nach mechanischer Unterbindung der sekretorischen Pankreasenzyme	38
4.5. Pharmakologischer Einfluß auf die Verdauungsenzyme bei Eiweißverdauung durch EDTA und Trasylol	44

4.6.	Beeinflussung der Mucosapermeabilität des Verdauungstraktes für Proteine nach oralen Gabe von Aspirin	49
4.7.	Untersuchung der pathologischen Einflüsse von EDTA, Trasylol und PGG	58
4.8.	Verlängerung von allogenem Hauttransplan- tationsüberlebenszeiten nach oraler Gabe von ALS, Aspirin, Trasylol und EDTA	61
5.	Diskussion	65
6.	Zusammenfassung	78
7.	Literaturverzeichnis	81

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PGG	=	Pferdegammaglobulin
ALS	=	Antilymphozytenserum
EDTA	=	Äthylendiaminessigsäure
cpm	=	counts per minute
n	=	Anzahl der Versuchstiere
$\bar{x}$	=	Mittelwert
$s\bar{x}$	=	Standardabweichung
appl.	=	appliziert
D.	=	Dosis
Org.	=	Organ
ges.	=	gesamt
mark.	=	markiert

1. Einleitung

Sowohl durch die Atemwege als auch über den Magen-Darm-Trakt kommt ein Organismus täglich mit einer Vielfalt von artfremden Substanzen in Kontakt. Um die Integrität zu erhalten, verfügt ein Körper über potente Abwehrmechanismen. Schon vor 75 Jahren beschäftigten sich einige Autoren (8,9) mit der immunologischen Abwehrreaktion eines Organismus auf körperfremde Stoffe wie zum Beispiel auf Mikroorganismen.

BORDET'S Untersuchungen (8,9) erbrachten den Nachweis, daß nicht nur infektiöse, sondern auch nicht infektiöse Substanzen eine Immunantwort des Organismus auslösen. Zu dieser Erkenntnis gelangte er dadurch, daß er Kaninchen defibriniertes Blut oder Milch einer anderen Spezies injizierte. Dabei erkannte er, daß diese Kaninchen hämagglutinierende oder präzipitierende Antikörper gegen das injizierte Material in einer bestimmten Zeitperiode bildeten. Diese Beobachtungen zeigten, daß die allgemeine Immunantwort auf Bakterien und deren Toxine nur eine besondere Form eines viel allgemeineren Prinzips darstellten, nämlich der immunologischen Abwehrreaktion eines Organismus gegen fremde, als Antigene wirksame Substanzen.

Heute besteht kein Zweifel mehr, daß die primäre Funktion

des Immunsystems darin besteht, die Integrität des Organismus dadurch zu sichern, daß alles, was vom Organismus als fremd registriert wird, zu eliminieren ist.

Für den Magen-Darm-Trakt ist durch den potenten enzymatischen Abbau nur eine geringe Möglichkeit gegeben, daß artfremde Antigene zu einer immunologischen Reaktion führen.

So ist heute immer noch die Lehrmeinung von Physiologen und Ernährungsphysiologen (26) vertreten, daß oral aufgenommenes Eiweiß im Magen-Darm-Trakt enzymatisch bis zu den kleinsten Bausteinen, den Aminosäuren, gespalten wird, die nicht immunogen sind. Nur in dieser Form sollen Fremdproteine resorbiert werden. Wenn diese Ansicht richtig wäre, dann dürfte es nach der oralen Zufuhr von Fremdproteinen niemals zu Unverträglichkeitserscheinungen kommen, die wohl im wesentlichen nur von intakten immunogenen Eiweißen hervorgerufen werden können. Bei Patienten, die auf die orale Zufuhr bestimmter artfremder Proteine mit Unverträglichkeitssymptomen reagieren, wurden die immunogenen Formen dieser bestimmten artfremden Proteine im Serum nachgewiesen (5, 16, 22, 24, 33). Es wurde daraus gefolgert (40), daß in diesen Fällen entweder ein defekter Resorptionsmechanismus im Magen-Darm-Kanal die Darmwand-

passage von immunogenen Proteinen begünstigt oder daß diese Menschen gegen bestimmte Nahrungsmittelantigene im Magen-Darm-Trakt eine nicht normal funktionierende Immunabwehr haben, was sich dann in einer klinischen Unverträglichkeitsreaktion äußert. Jedoch wurde von einigen Autoren (4, 17, 20, 22, 23, 36, 37, 45) auch bei gesunden Personen, die nach einer Proteinnahrung keine Unverträglichkeitsreaktionen zeigten, ein bestimmter Anteil funktionsfähiger Fremdproteine im Serum gefunden. Daraus könnte man rein hypothetisch folgern, daß es einen Mechanismus gibt, der, sofern es nicht zu Unverträglichkeitsreaktionen kommt, oral aufgenommene immunogene Proteine zu tolerogenen Proteinen umwandelt. So ist bekannt, daß es nach oraler Applikation von PGG (40) bei Ratten nur in einem ganz geringen Prozentsatz zur Bildung von Antikörpern kommt. Darüber hinaus wird PGG über den Darm aber auch in großmolekularer Form resorbiert. So bietet sich an, daß man ein therapeutisch wirksames Fremdserum wie das Antilymphozytenserum (ALS) nicht parenteral sondern oral verabreicht.

2. Ziel der Arbeit

Das gastrointestinale System ist die physiologische Pforte, durch die körperfremde Stoffe in den Organismus gelangen. Bevor diese Stoffe vom Organismus aufgenommen werden können, werden sie allerdings in sehr unterschiedlicher Weise mehr oder weniger vorbehandelt, d.h. verdaut. Dann erst können sie durch die Internalschleimhaut hindurch in Blut und Lymphe gelangen.

Die Verdauung ist ein geordnet ablaufender Vorgang unter Mitwirkung einer großen Zahl von Enzymen, die von Speicheldrüsen, Magen- und Darmschleimhaut sowie vom exokrinen Teil des Pankreas produziert werden. Unterstützend wirken dabei im wesentlichen noch die Salzsäure des Magens und die gallensauren Salze der Leber. Die Aufnahme der verdauten Stoffe durch die Schleimhäute geschieht entweder durch aktiven Transport oder durch Diffusion.

Nach dem derzeitigen Wissensstand wird nur ein Teil der Nahrungsmittelproteine im Darmkanal vollständig bis zu den wasserlöslichen Aminosäuren abgebaut und als solche resorbiert (18, 46, 47). Ein anderer Teil wird in

Form von Polypeptiden, höhermolekularen Proteinbruchstücken oder sogar als völlig intaktes und damit immunogenes Protein in den Organismus aufgenommen (1, 6, 39, 41, 44).

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Überlebenszeit allogener Rattenhauttransplantate durch orale Applikation von ALS signifikant verlängert werden kann. (40).

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der lymphozytotoxische Titer eines heterologen ALS nach enteraler Applikation in der Lymphe von Ratten (39) nachweisbar ist. Dieser lymphozytotoxische Titer beweist nicht nur im Rattenmodell sondern auch bei Hunden eine signifikante periphere Lymphopenie (39).

Der wesentliche Vorteil der oralen Applikation von ALS im Vergleich zur parenteralen liegt darin, daß die Antikörperbildung gegen das zugeführte Fremdprotein bei weitem nicht so stark ist (40). Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob es möglich ist, den Anteil an großmolekularem Protein, welches aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert wird, durch zusätzliche Maßnahmen zu steigern.

Folgende Versuche wurden dazu durchgeführt:

- 1) Steigerung der Proteindosis (PGG)
- 2) Hemmung der Enzymaktivität im Darm
 - a) operativ (Unterbindung des ductus pancreaticus)
 - b) pharmakologisch (EDTA, Trasylol)
- 3) Erhöhung der Permeabilität der Mucosa (Aspirin)

Falls die Resorptionsrate durch die eine oder andere Maßnahme gesteigert werden könnte, müßte man im Falle von ALS auch eine bessere immunsuppressive Wirkung erwarten. Deswegen wurden im Anschluß an die Resorptionsstudien Hauttransplantationsversuche durchgeführt, um die Wirkung der verbesserten Resorption von ALS auf die Transplantatüberlebenszeit zu prüfen.

3. Material und Methode

3.1. Material

Für die Resorptionsversuche wurde Gammaglobulin vom Pferd mit einer Eiweißkonzentration von 50 mg/ml verwendet. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Hauttransplantationsversuchen an Ratten wurde ALS vom Pferd angewendet.

Zu diesem Zweck werden dem Pferd gereinigte Lymphozyten oder Thymozyten oder Zellmembranen dieser Zellen oder auch nur humorale Gammaglobuline der Ratte injiziert. Nimmt man nach erfolgter Immunisierung diesem Pferd Blut ab, so erhält man damit ein Antilymphozytenserum, das in der Lage ist, Lymphozyten von Ratten zu agglutinieren bzw. diese in Gegenwart von Komplement zu lysieren. Das für die Transplantationsversuche verwendete ALS hatte einen lymphozytotoxischen Titer von 1 : 512 nach Absorption des antierythrozytären Titers und einen Eiweißgehalt von 5 g%.

Als Medikamente wurden zusätzlich EDTA (Fa. Merck, Darmstadt), Trasylol (Fa. Bayer, Leverkusen) und Acetylsalizylsäure (Fa. Merck, Darmstadt) verwendet.

3.2. Isotopentechnische Meßverfahren

3.2.1. Radioaktive Markierung der oral zu applizierenden Fremdproteine (PGG) mit ^{131}J bzw. ^{125}J

FRANKS, TAKEDA und REVEE (23) beschrieben eine Methode zur radioaktiven Markierung von Proteinen, nach der im Rahmen dieser Arbeit verfahren wurde. Dazu wurde das Protein auf 4°C in einer Glaskammer abgekühlt und mit einem Glyzine-Gemisch im Verhältnis 1 : 0,5 gepuffert. Daneben wurden $100\text{ }\mu\text{Ci Na }^{131}\text{J}$ (bzw. $\text{Na }^{125}\text{J}$) (spezifische Aktivität 5 - 20 Ci $^{131}\text{J}/\text{mg J}$ bzw. spezifische Aktivität 0,98 mCi/ml $< 10\text{ }\mu\text{gJ}$; Fa. Buchler, Amersham, Braunschweig) mit physio-

logischer Kochsalzlösung auf 1 ml verdünnt. Nach Zugabe von 4 Tropfen 1n HCl wurde dieses Gemisch auf ca. 40°C erwärmt und anschließend schnell wieder abgekühlt. Durch Zutropfen eines Na-Jodid/Jodat-Puffers entstand durch Oxydation graubraunes Jod. In dieser Form wurde das radioaktive Jod in die mit der gepufferten Proteinlösung gefüllte Glaskammer gegeben. Ein violetter Ring zeigte die gelungene Markierung an, der durch intensives Rühren wieder verschwand. Dies war der Nachweis, daß sich das radioaktive Jod an die Doppelbindung des Tyrosinringes geheftet hatte. Danach wurden noch 4 Tropfen 0,1 n HCl in die Markierungskammer hinzugegeben. Da bei dieser Markierungsanordnung nicht gewährleistet ist, daß ungebundenes, radioaktives Jod vorhanden ist, mußte noch eine Trennung des markierten Pferdegammaglobulins (PGG) vom ungebundenen Indikator durchgeführt werden. Diese Trennung wurde mittels Gelchromatographie über eine Sephadex-Säule (G - 25 fine, Fa. Pharmacia, Schweden) durchgeführt.

Beide zu trennende Substanzen sind in ihrem Molekulargewicht stark unterschiedlich, sodaß mit der gewählten Versuchsanordnung eine gute Trennung möglich war.

Eine Kontrolle der Qualität des radioaktiv markierten PGG's ergab einige Tage später, daß über 99 % der Radioaktivität

noch an das Protein gebunden waren. Die Kontrolle bestand im Ausfällen der proteingebundenen Radioaktivität durch Anwendung von 10 %iger Trichloressigsäure bzw. auch 3 %iger Perchlorsäure und Messen der Restaktivität im Überstand.

Für eine parenterale Applikation von radioaktiv markierten Proteinen wurde unter streng sterilen Kautelen gearbeitet.

3.2.2. Trennung von groß- und kleinemolekularen radioaktiv markierten Proteinen nach der Methode der Radiochromatographie mit Sephadex-Gelen

Zur Trennung der unterschiedlich großen Proteinstrukturen wurden mit aufgequollenem Sephadex G-25 angefüllte Glassäulen mit einem Innendurchmesser von 2 cm, einer Höhe von 25 cm und einer Porzellanfritte verwendet. Der Auslaufstutzen dieser Röhren ist durch einen Glashahn regulierbar. Für ein exaktes Trennungsverfahren ist eine stets gleichbleibende Höhe vom Sephadex erforderlich. Ebenso darf immer nur die gleiche Flüssigkeitsmenge bzw. das zu trennende Eiweiß über der Sephadex-Säule stehen. Nur dann sind die Sinkverhältnisse der Eiweißmoleküle für alle Messungen als konstant anzusehen. Im Verlauf des Trennungsverfahrens ist

deshalb immer für einen gleichbleibend hohen Flüssigkeitsspiegel über der Sephadex-Säule zu sorgen. Dies geschieht durch permanentes, kontrolliertes Auffüllen mit Kochsalzlösung.

Das tropfenweise Auffangen des Eluats garantiert eine normierte Zuordnung der ausgelaufenen Proteine als Funktion der Zeit.

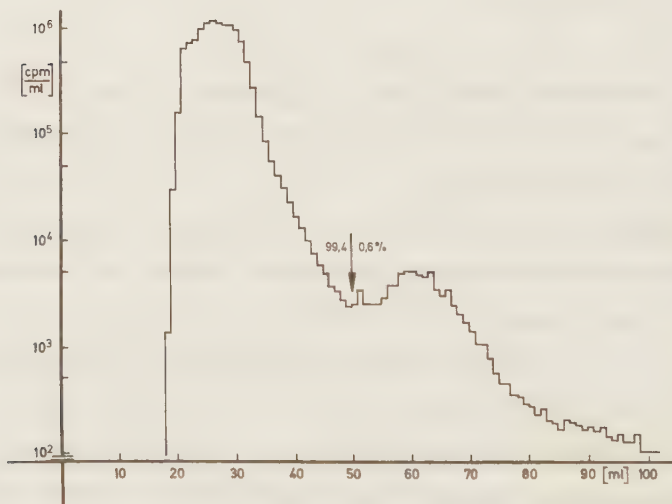


Abb. 1 Enteral resorbiertes groß- und kleinmolekulares Eiweiß (nach der Methode der Radiochromatographie mit Sephadex-Gelen bestimmt)

Je 10 Tropfen des Auslaufvolumens wurden aufgefangen und deren Radioaktivität bestimmt. Diese Messungen zeigen im wesentlichen 2 Eiweißfraktionen. Die erste Fraktion, die durch den 1. Peak der Radioaktivität gekennzeichnet ist, entspricht dem großmolekularen Eiweiß (siehe Abb. 1).

3.2.3. Quantitative Bestimmung von radioaktiv markiertem Protein nach dem Verfahren der Szintillationszählung für Gammastrahlen

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden ^{125}J bzw. ^{131}J verwendet. Beide Isotope emittieren Gammastrahlen. Voraussetzung für die Zählung dieser Isotope ist eine gleiche Füllhöhe der Zählröhrchen und darüber hinaus eine exakte Kanaljustierung im Zähler. Als Zählgerät wurde ein 3-Kanal-Gamma-Szintillations-Zähler der Firma Packard, USA, verwendet.

3.2.4. Festimmung der Organverteilung der aufgenommenen Fremdproteine

Verabreicht man Ratten radioaktiv markiertes Fremdprotein oral, so wird es in gewissem Umfang enteral resorbiert und gelangt über Blut und Lymphe in die Organe. Bei Anwendung von resorptionssteigernden Mitteln ist es deswegen wichtig,

die Organverteilung zu bestimmen. Deshalb wurden bei Ratten 6 Stunden nach der oralen Applikation von radioaktiv markiertem PGG die Organverteilungen bestimmt. Dazu wurden die Tiere getötet, entblutet und folgende Organe in toto herausgenommen: Milz, Niere, Lunge, Leber, Schilddrüse, Dünndarm, Dickdarm und Magen. Jedes Organ bzw. auch Blut und Serum wurde gewogen und von einem Aliquot wurde mittels eines Gamma-Szintillationszählers (Fa. Packard, USA) die Radioaktivität in counts per minute (cpm) bestimmt. Die gemessene Radioaktivität wurde anschließend auf ein Gramm Organ bezogen. Die Radioaktivität des gesamten herausgenommenen Organs wird im folgenden als Gesamtaktivität pro Organ bezeichnet. Weiterhin wurde die gemessene Radioaktivität pro Gramm Organ bzw. Gesamtaktivität in Relation zu der gesamten applizierten Radioaktivität gesetzt. Dies entsprach dann der prozentualen Radioaktivität. Da das radioaktiv markierte Protein enteral verabreicht worden ist, wurde die nach 6 Stunden noch vorhandene Radioaktivität als Restradioaktivität bzw. die fehlende Menge als Resorptionsrate bezeichnet.

3.3. Immunologische Meßverfahren

3.3.1. Prinzip der Doppeldiffusionsmethode im Agargel zum immunologischen Nachweis von resorbierten Proteinen in Blut und Lymphe bzw. von Antikörpern gegen oral appliziertes Pferdeprotein

Wendet man, wie es bei den vorliegenden Untersuchungen geschah, die Mikromethode der Agargeldoppeldiffusion, nach OUCHTERLONY (35), an, dann sind bei diesem Verfahren nur sehr geringe Substanzmengen erforderlich.

Vorbereitende Maßnahmen waren:

- 1) Reinigen der noch unbeschichteten Objektträger mit CrSO_4
- 2) Fortlaufende Numerierung der Gläser mit Folientusche
- 3) Herstellen des Agars, Bestandteile:
 - a) Michaelispuffer: 9.81 g Na-Veronal
6,48 g NaAc x $3\text{H}_2\text{O}$
60 ml 0,1 n HCl
 - b) Für den Gebrauch wurde der Puffer mit aqua dest. im Verhältnis 1 : 2 verdünnt (ph: 8,6).
 - c) Die Zugabe von Agarpulver (Fa. Behringwerke, Marburg) und anschließendes Erhitzen machen das Agar gebrauchsfertig.

Als nächstes wurden die Objektträger mit einer 2 %igen Agarlösung eingestrichen, um den Hafthalt der eigentlichen Träger-

substanz sicherzustellen. Die Trägersubstanz besteht aus einer 1,5 %igen Agarlösung. Auf jeden Objektträger werden 3 ml dieser erwärmten Agar-Lösung mittels Saugpipette aufgetragen und die Objektträger anschließend in eine feuchte Kammer gelegt. Die nachfolgende Abkühlung ließ die aufgetragene Agarlösung vom Sol- in den Gelzustand übergehen. Jetzt konnten in das Agar Löcher, die als Reservoir für die zu untersuchenden Seren dienten, eingestanz't werden.

Bringt man gelöste Antikörper und deren Antigene auf mit Agargel beschichtete Objektträger, so diffundieren beide Stoffe aufeinander zu und bilden Präzipitationslinien aus. Dieser Vorgang eignet sich besonders gut zur Darstellung spezifischer Antigen-Antikörper-Reaktionen OUCHTERLONY (35).

Nach dem Einbringen der Seren dauert es zwischen 24 und 72 Stunden, bis sich sichtbare Präzipitate ausbilden.

Nach abgeschlossener Diffusion der Proteine werden die Objektträger in physiologischer Kochsalzlösung 3 Tage lang gewässert, wobei jeden Tag ein neues Bad angesetzt wurde. Nach anschliessendem Spülen mit aqua dest. und vorsichtigem Abtrocknen mit Fliespapier wurden die mit Agargel

beschichteten Objektträger getrocknet.

Die Färbung der Präzipitate erfolgte mit Amidoschwarzlösung, welche folgende Zusammensetzung aufwies: 1 g Amidoschwarz, 6,12 g NaAc x 3 H₂O, 2,6 ml Eisessig, 100 ml Glycerin, aqua dest. ad 500 ml.

3.4. Biologische Testverfahren

3.4.1. Mechanische Unterbindung der sekretorischen Pankreasenzyme bei Ratten

Die sekretorischen Verdauungsenzyme des Pankreas spielen bekanntlich bezüglich der Resorption großmolekularer Proteine eine wesentliche Rolle. Um diese enzymatische Aktivität zu reduzieren, wurde der ductus pancreaticus kurz vor seiner Eintrittsstelle in den Dünndarm unterbunden. Selbstverständlich werden durch diese Maßnahme nicht alle sekretorischen Verdauungsenzyme dem Darmtrakt entzogen, aber die Menge dieser Enzyme wird stark reduziert (18).

Das gleiche Ergebnis erreicht man, wenn man statt der Unterbindung der Bauchspeicheldrüsenausführgänge am Übergang Duodenum /Jejunum eine Ligatur um den Dünndarm legt.

Bei dieser Versuchsgruppe wurde dann das Protein intrajejunal

verabreicht und zwar unterhalb der Unterbindung.

3.4.2. Hauttransplantationstechnik

Als Versuchstiere wurden Ratten verwendet: schwarze, in-gezüchtete BD_6 -Ratten und weiße, koloniegezüchtete Sprague-Dawley-Ratten. Das Körpergewicht je Ratte lag zwischen 270 g und 290 g.

Dabei dienten die schwarzen, ingezüchteten BD_6 -Ratten für die Hauttransplantate als Spender und die weißen, koloniegezüchteten Sprague-Dawley-Ratten als Empfänger. Zur Kontrolle der angewandten Transplantationstechnik wurde bei den Sprague-Dawley-Ratten noch zusätzlich eine Autotransplantation durchgeführt, wobei die Eigenhaut so eingesetzt wurde, daß die Haare gegen die Richtung des übrigen Fells zeigten.

Zur Vorbereitung wurden bei schwarzen BD_6 -Ratten, welche als Spendertiere dienten, im Ätherrausch die Rückenhaare entfernt. Dann wurde sowohl auf der linken als auch auf der rechten Seite des Rückens je ein etwa 5 Pfennig großes Stück Haut herausgestantzt. Nach dem Abpräparieren des Unterhautfettgewebes wurden die Hautstückchen bis zu ihrer Weiterverwendung in isotoner NaCl-Lösung aufbewahrt. Anschließend wurden die weißen Sprague-Dawley-Ratten, also die Empfängertiere mit Chloralhydrat (36 mg/100 g) narkotisiert. Das Entfernen der Rückenhaare

und das Ausstanzen der Hautstücke erfolgte ganz analog, wie oben beschrieben, für die Spendertiere. Nach Freipräparation vom Unterhautfettgewebe wurde nun das weiße linke Hautstückchen der Sprague-Dawley-Ratte in die rechte Stanzlücke eingepaßt. In den noch verbliebenen linken Defekt wurde das von den schwarzen BD₆-Ratten stammende Allotransplantat eingefügt.

Die Befestigung der Hauttransplantate erfolgte mit Histoacrylkleber (Fa. Braun, Melsungen). Dabei wurden die Wundränder nicht ringsherum, sondern punktförmig mit einem Abstand von 1 mm aneinander adaptiert.

Zum Schutz gegen das Annagen wurde ein Fliegendrahtgitter über den Transplantaten mit einem Leukoplaststreifen befestigt. Die operierten Tiere wurden in Einzelkäfigen bei normaler Kost und Wasser gehalten.

Alle operativen Maßnahmen wurden unter sterilen Kautelen durchgeführt.

3.4.3. Beurteilung der Hauttransplantatabstoßung

Die Transplantate wurden täglich inspiziert und, falls notwendig, die Schutzgitter erneuert. Für die Beurteilung der

Transplantatabstoßung wurden die gleichen Kriterien angewandt, wie sie unter anderem auch SEIFERT (40) beschrieben hat.

Eine beginnende Abstoßung ist durch eine Schrumpfung des Transplantats charakterisiert. Weiterhin kann man dabei schon mit bloßem Auge Farbveränderungen erkennen. Palpiert man ein abgestoßenes Hauttransplantat, so stellt man eine lederartige Verhärtung fest.

In früheren differenzierteren Untersuchungen der Abstoßung von Rattenhauttransplantaten wurde weiterhin festgestellt (40), daß über dem Transplantat ein Temperaturabfall von $0,4^{\circ}\text{C}$ gegenüber der Eigenhaut besteht. Diese Messungen decken sich sehr gut mit den subjektiven Beurteilungen wie Schrumpfung, Braunfärbung und lederartige Verhärtung als Palpationsbefund. Aus diesem Grund soll bei den nachfolgenden Transplantationsversuchen auf die Messung der Temperaturdifferenz bzw. der Thymidineinbaurate (40) verzichtet werden.

Ein Transplantat gilt als abgestoßen, wenn eine Braunfärbung und darüber hinaus noch eine lederartige Verhärtung registriert wird.

3.5. Orale Applikation von Medikamenten

Um bei den Hauttransplantationsversuchen an den Ratten ernährungsbedingte Fehler auszuschalten, wurden alle Tiere unter Standardbedingungen gehalten, d.h. sie erhielten alle in gleicher Weise Altrominfutter und Wasser in ausreichender Menge.

Zur oralen Applikation von Medikamenten wurden die Ratten in einen leichten Ätherrausch versetzt. In diesem Zustand wurde dann ein dünner Schlauch in den Magen eingeführt. So konnte die gewünschte Dosis des betreffenden Medikaments quantitativ exakt appliziert werden.

Wenn nicht anders angegeben, erhielten die Ratten einmal täglich eine bestimmte Dosis eines Medikaments und zwar in dem Zeitraum zwischen der Transplantation und dem Zeitpunkt der Transplantationsabstoßung verabreicht.

3.6. Versuchsgruppen

Zur Klärung der Frage, ob die enterale Resorption großmolekularer Proteine verbessert werden kann, dienten folgende Versuche:

A) Resorptionsversuche

I. Erhöhung der Dosis von PGG:

Gruppe 1 (n = 5) : 12,5 mg ^{131}J PGG 1 x oral

Gruppe 2 (n = 5) : 25,0 mg ^{131}J PGG 1 x oral

Gruppe 3 (n = 5) : 50,0 mg ^{131}J PGG 1 x oral

II. Hemmung der Enzymaktivität:

a) operativ durch Unterbindung des ductus pancreaticus

Gruppe 4 (n = 4) : 37,5 mg ^{131}J PGG 1 x intraduodenal

b) pharmakologisch durch Trasylol bzw. EDTA

Gruppe 5 (n = 5) : Trasylol (100.000 K.I.E.) + 25 mg PGG

Gruppe 6 (n = 5) : EDTA (100 mg) + 25 mg PGG

Gruppe 7 (n = 5) : 25 mg PGG + EDTA (100 mg) +
Trasylol (100.000 K.I.E.)

III. Erhöhung der Permeabilität des Mucosa mit Aspirin:

Gruppe 8 (n = 5) : 0,03 g Aspirin + 25 mg PGG 1 x oral

B) Transplantationsversuche (orale Applikation)

Gruppe 9 (n = 9) : 1 ml ALS tgl. bis zur Abstoßung

Gruppe 10 (n = 4) : 5 ml ALS tgl. bis zur Abstoßung

Gruppe 11 (n = 8) : 1 ml ALS + 0,03 g Aspirin
tgl. bis zur Abstoßung

Gruppe 12 (n = 10) : 0,03 g Aspirin tgl. bis zur Abstoßung

Gruppe 13 (n = 10) : 0,06 g Aspirin tgl. bis zur Abstoßung

Gruppe 14 (n = 4) : 1 ml ALS + Trasylol (100.000 K.I.E.)

tgl. bis zur Abstoßung

Gruppe 15 (n = 7) : Trasylol (100.000 K.I.E.)

tgl. bis zur Abstoßung

Gruppe 16 (n = 8) : EDTA (100 mg)

tgl. bis zur Abstoßung

4. Ergebnisse

4.1. Enterale Resorption von oral verabreichten, markierten Proteinen

Von wesentlichem Interesse bezüglich der enteralen Resorption großmolekularer Proteine bei Ratten ist auch die Beantwortung der Frage, wie sich die enterale Resorption in Abhängigkeit von der Menge des oral applizierten Fremdproteins verhält. Zur Untersuchung dieser Frage wurde Pferdegamma globulin (PGG) verwendet.

Um überhaupt einen Eindruck von der Resorption des radioaktiv markierten PGG's zu bekommen, wurde die Radioaktivität in 1 ml Blut nach unterschiedlicher Dosierung (12,5 mg, 25 mg, 50 mg) über die Zeit von 6 Stunden verfolgt (siehe Abb. 2). Die Werte wurden in Bezug zur oral applizierten Radioaktivität gesetzt.

Um anschließend eine Zuordnung zwischen der Menge des verabreichten PGG's einerseits und andererseits der Meßergebnisse der Radioaktivität zu erhalten, wurde vor der Gabe des PGG die radioaktive Intensität der einzelnen PGG-Mengen bestimmt (Standardwerte).

Menge ^{131}I - PGG [ml]	cpm	PGG [mg]
0,5	77380	12,5
1,0	154770	25,0
2,0	309540	50,0

Tab. 1 Standardwerte der oral verabreichten PGG-Mengen

Der erste Versuch in dieser Testreihe besteht darin, 5 Ratten jeweils 0,5 ml ^{131}I - PGG ($\hat{=}$ 12,5 mg) oral zu verabreichen. Zum Zeitpunkt der Applikation begann die Registrierung der stündlichen Abstände, in denen die resorbierte ^{131}I -PGG-Menge im Blut zu bestimmen war.

Die Einzelergebnisse dieser Gruppe von Ratten sind in Tab. 2 dargestellt. Auffallend ist dabei, daß die stündlichen Werte der einzelnen Ratten, ausgenommen Ratte Nr. 2,

sehr gut zusammenliegen. Dies äußert sich auch in einer relativ geringen Standardabweichung. Über die Zeit von 6 Stunden nehmen alle Werte um ca. 50 % ab. Nach Abschluß des Experimentes ist Radioaktivität im Blut immer noch nachweisbar, d.h. die Ausgangswerte wurden zu diesem Zeitpunkt noch nicht erreicht. Die höchsten Werte wurden durchschnittlich 2 Stunden nach oraler Applikation des PGG gemessen.

	I.Std.	2.Std.	3.Std.	4.Std.	6.Std.
Ratte 1	0,3153	0,3760	0,2675	0,2364	0,1514
Ratte 2	0,0478	0,1537	0,098	0,1033	0,1188
Ratte 3	0,3592	0,3566	0,3502	0,2662	0,1731
Ratte 4	0,2403	0,2636	0,2468	0,1938	0,2209
Ratte 5	0,4510	0,3967	0,2752	0,2571	0,2235
$\bar{x}$	0,28	0,31	0,25	0,21	0,18
$s_{\bar{x}}$	+ 0,07	+ 0,05	+ 0,04	+ 0,03	+ 0,02

Tab.2 Anteil der applizierten Dosis (0,5 ml ^{131}J PGG) auf 1 ml Rattenblut bezogen.

Im zweiten Versuch wurden entsprechende Messungen bei oraler Gabe von 1 ml ^{131}J PGG (25 mg) durchgeführt. Obwohl die Tiere das gleiche Körpergewicht besaßen wie die Ratten der Gruppe 1, fällt bei den Ergebnissen der Tab. 3 auf, daß durchschnittlich niedrigere Radioaktivitätskonzentrationen im Blut der Ratten vorhanden waren, wenn man sie mit Gruppe 1 vergleicht. Das Verhalten des Resorptionsmaximums und der anschließenden Verminderung ist ähnlich, wie in Tab. 2 beobachtet, wobei 50 % des Maximums nur in zwei Fällen erreicht werden.

	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	6 Std.
Ratte 1	0,2771	0,3695	0,3359	0,3191	0,3243
Ratte 2	0,2636	0,2655	0,2319	0,1860	0,1505
Ratte 3	0,1279	0,1550	0,1201	0,1240	0,0846
Ratte 4	0,1983	0,1402	0,1208	0,1621	0,1079
Ratte 5	0,1382	0,1731	0,1660	0,1486	0,0885
$\bar{x}$	0,2010	0,2206	0,1949	0,1911	0,1511
$S\bar{x}$	$\pm 0,0308$	$\pm 0,043$	$\pm 0,0400$	$\pm 0,032$	$\pm 0,0448$

Tab. 3 Anteil der applizierten Dosis (1 ml ^{131}J PGG) auf 1 ml Rattenblut bezogen

Im dritten Versuch (Gruppe 3) wurden entsprechende Messungen bei oraler Gabe von 2 ml ^{131}J PGG durchgeführt.

	I.Std.	2.Std.	3.Std.	4.Std.	6.Std.
Ratte 1	0,19	0,16	0,15	0,15	0,11
Ratte 2	0,08	0,09	0,07	0,0969	0,0894
Ratte 3	0,1095	0,0946	0,0817	0,0683	0,0513
Ratte 4	0,0575	0,1017	0,1007	0,1040	0,1088
Ratte 5	0,0962	0,1103	0,1101	0,0839	0,0678
$\bar{x}$	0,1066	0,1142	0,1025	0,0996	0,0854
$s\bar{x}$	$\pm 0,022$	$\pm 0,012$	$\pm 0,013$	$\pm 0,014$	$\pm 0,0114$

Tab. 4 Anteil der applizierten Dosis (2 ml ^{131}J PGG)
auf 1 ml Rattenblut bezogen

Steigert man die Dosis weiter auf 50 mg Pferdegammaglobulin, also um das vierfache der Ausgangsdosis, so erreicht man damit eine weitere Verminderung der Radioaktivität in einem ml Blut. Auch der Rückgang der Radioaktivität über die Zeit von 6 Stunden ist langsamer, als nach Gabe von 12,5 mg Pferdegammaglobulin.

Um das Ergebnis der Versuche 1 - 3 übersichtlicher zu gestalten, sind nachfolgend die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen zum Vergleich auf Abb.2 zusammengestellt.

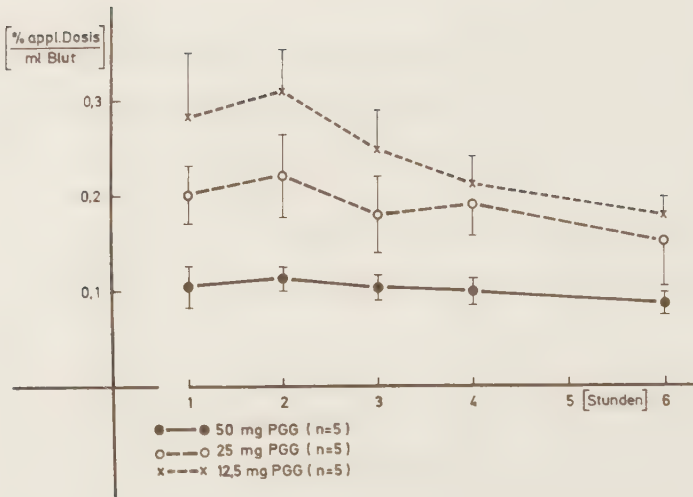


Abb. 2 Prozentuale Anteile der applizierten Menge
an ^{131}J PGG pro ml Rattenblut und die dazu-
gehörigen Standardabweichungen

Der Vergleich der unterschiedlichen Dosierung zeigt klar, daß bei der Resorption von PGG eine Dosisabhängigkeit vorhanden ist. In dem von uns gewählten Bereich besteht die Beziehung: je größer der Proteingehalt, desto weniger wird prozentual resorbiert. Das würde die Überlegung unterstützen, daß auf keinen Fall rein passive Resorptions-

vorgänge für die Aufnahme von großmolekularen Proteinen verantwortlich sind, sondern daß enzymatische Vorgänge, besonders bei Dosissteigerung, die Aufnahme von Fremdproteinen beeinflussen.

Zuviel sollte man jedoch bezüglich der hier aufgeführten Unterschiede noch nicht vermuten, da die hier angegebene Radioaktivität in % der applizierten Dosis nicht identisch ist mit dem resorbierten, großmolekularen Pferdegamaglobulin. In diesen Werten sind nämlich noch markierte Bruchstücke bzw. die Markierung ohne Proteinbindung enthalten.

4.2. Nicht enteral resorbierte, markierte Proteine (d.h. Restaktivität) nach oraler Gabe.

Um den Verbleib des nicht enteral resorbierten Proteins zu untersuchen, wurde die Radioaktivität im gastroenteralen Trakt gemessen und zwar über die Bestimmung der sogenannten Restaktivität. Alle angegebenen Werte beziehen sich auf Messungen jeweils 6 Stunden nach der oralen Applikation des ^{131}J PGG.

Um die unterschiedlichen Organgewichte der einzelnen Versuchsratten als Fehlerquelle in den einzelnen Ergebnissen zu eliminieren, erscheint es sinnvoll, die relative Restaktivi-

tät der Magen-Darm-Abschnitte jeweils auf 1 g Gewebe zu beziehen. Aus dem Organgewicht und der Restaktivität des Gesamtorgans ergibt sich durch Division der Gesamtorganrestaktivität und dem Organgewicht die spezifische Restaktivität, d.h. die Restaktivität auf 1 g Organgewebe bezogen (siehe Tab. 5 - 7).

	Magen (cpm i. % appl.D./Org)	Dünndarm (cpm i. % appl.D./Org.)	Dickdarm (cpm i. % appl.D./Org)	gesamt (cpm i. % appl.D./Org)
Ratte 1	64,38	2,46	1,69	68,49
Ratte 2	56,25	3,87	1,07	61,19
Ratte 3	14,39	4,20	5,01	23,60
Ratte 4	26,10	3,07	2,12	31,29
Ratte 5	24,39	2,39	3,44	30,22
$\bar{x}$	37,10	3,20	2,67	42,96
$S\bar{x}$	$\pm 9,77$	$\pm 0,37$	$\pm 0,70$	$\pm 9,10$

Tab. 5 Relative spezifische Restaktivität (%/g Organ-
gewicht) im Magen, Dünndarm, Dickdarm bzw. im
Magen-Darm-Trakt nach enteraler Gabe von 0,5 ml
 ^{131}J PGG nach 6 Stunden

Bei Betrachtung der Einzelwerte (siehe Tab. 5) fällt auf, daß nach Verabreichung von 12,5 mg PGG die höchste spezifische Restaktivität im Magen verblieben ist. Dabei streuen die Werte beträchtlich, was sich in den großen Standardabweichungen niederschlägt. Im Dünndarm sind zwar größere spezifische Restaktivitäten zu finden, der Unterschied zu den Dickdarmwerten ist jedoch statistisch nicht signifikant.

	Magen (cpm i. % appl.D./Org)	Dünndarm (cpm i. % appl.D./Org)	Dickdarm (cpm i. % appl.D./Org)	gesamt (cpm i. % appl.D./Org)
Ratte 1	32,76	7,01	6,65	46,42
Ratte 2	27,91	1,40	3,76	33,07
Ratte 3	53,88	2,46	5,68	62,02
Ratte 4	57,13	2,32	2,66	62,11
Ratte 5	69,58	2,02	1,03	72,63
$\bar{x}$	48,25	3,04	3,69	55,25
$\bar{Sx}$	$\pm 7,81$	$\pm 1,01$	$\pm 1,01$	$\pm 6,95$

Tab. 6 Relative spezifische Restaktivität (%/g Organ-
gewicht) im Magen, Dünndarm, Dickdarm bzw. im
Magen-Darm-Trakt nach enteraler Gabe von 1 ml
 ^{131}J PGG nach 6 Stunden

Nach Verdoppelung der applizierten Ausgangsdosis sind sowohl im Magen als auch in Dünnd- und Dickdarm höhere Restaktivitäten zu finden, als nach einer niedrigeren Dosis (siehe Tab. 6).

	Magen (cpm i. % appl.D/Org.)	Dünndarm (cpm i. % appl.D/Org.)	Dickdarm (cpm i. % appl.D./Org.)	gesamt (cpm i. % appl.D./Org.)
Ratte 1	41,04	1,67	1,42	44,13
Ratte 2	66,67	2,32	0,80	69,79
Ratte 3	71,81	1,24	0,83	73,88
Ratte 4	59,99	5,02	1,28	66,29
Ratte 5	50,04	2,12	1,09	53,25
$\bar{x}$	59,91	2,47	1,08	61,47
$S\bar{x}$	$\pm 5,51$	$\pm 0,66$	$\pm 0,12$	$\pm 5,54$

Tab. 7 Relative spezifische Restaktivität (%/g Organ-
gewicht) im Magen, Dünndarm, Dickdarm bzw. im
Magen-Darm-Trakt nach enteraler Gabe von 2 ml
 ^{131}J PGG nach 6 Stunden

Von wesentlicher Interesse sind nicht so sehr die relativen Restaktivitäten der Magen-Darm-Abschnitte, sondern vielmehr deren relative Resorptionsraten. Letztere ergeben sich aus der Differenz der relativen Organrestaktivitäten und der oral in den Magen-Darm-Trakt verabreichten Dosis ($\hat{=}$ 100 %).

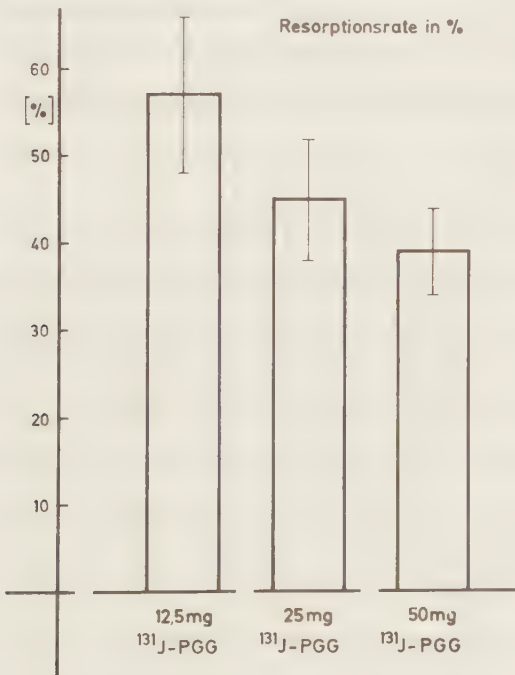


Abb. 3 Relative Resorptionsrate aus dem Magen-Darm-Trakt nach oraler Gabe von ^{131}J PGG

Bemerkenswert an diesem Ergebnis ist, daß sich die relativen Resorptionsraten, bezogen auf den gesamten Magen-Darm-Trakt, nicht mit steigender oral applizierter Dosis vergrößern, sondern vielmehr verringern.

Wenn auch die Unterschiede zwischen den Resorptionsraten nach Applikation von 12,5 mg PGG und 25 mg PGG statistisch nicht signifikant sind, so lassen sie doch vermuten, daß eine weitere Dosissteigerung zu signifikanten Änderungen führt.

Betrachtet man den Magen alleine, so ergibt sich dieselbe Tendenz wie für den gesamten Magen-Darm-Trakt. Dünndarm und Dickdarm verhalten sich bei den meisten Meßwerten jedoch umgekehrt wie der Magen, wenn man das Meßergebnis für den Dickdarm bei oraler Verabreichung von 25 mg ^{131}J PGG vernachlässigt.

4.3. Verteilung der Radioaktivität in groß- und kleinmolekulare Fremdproteine nach der Darmwandpassage

Das Szintillationsverfahren liefert nur Ergebnisse bezüglich der Radioaktivitätskonzentrationen im Serum bzw. in den Organen. Die Problemstellung der Versuche, die Aufschluß über die großmolekulare, enterale Resorption von PGG geben sollen, wird deshalb durch die Szintillationsmessungen alleine keineswegs gelöst. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, werden nach oraler Gabe von Fremdproteinen sowohl Aminosäuren als auch kleinere Proteine und großmolekulare Proteine resorbiert. Nachdem das PGG vor den Versuchen in toto radioaktiv markiert wurde, mußte ein zusätzliches Verfahren angewendet werden, um aus der Radioaktivität des entnommenen Rattenblutes Aufschluß darüber zu bekommen, wieviel von der Radioaktivität von großmolekularen, resorbierten, markierten Proteinen herrührt und wieviel von kleinmolekularen, markierten Proteinen (Bruchstücken) bzw. von Aminosäuren. Einen Aufschluß über diese Fragestellung liefert die zusätzliche Anwendung der Sephadex-Gel-Chromatographie (G-25), mit deren Hilfe es möglich ist, die unterschiedlichen Mengen an den verschieden großen, resorbierten Proteinen zu trennen.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Mengen der groß- und kleinmolekularen, resorbierten, radioaktiv markierten Proteine einerseits und der radioaktiv markierten, großmolekularen Proteine (Fraktion 1) andererseits gegenübergestellt. Das Ratten Serum, das diesen Messungen zugrunde lag, wurde eine Stunde bzw. sechs Stunden nach der oralen Gabe von ^{131}J PGG den Tieren entnommen.

	nach 1h			nach 6h		
resorbiertes ^{131}J PGG (ml) (ursprüngliche Dosis)	12,5	25,0	50,0	12,5	25,0	50,0
Anteil d. resorbierten Proteinmenge i. Vergl. zur oral verabreichten [%/ml]	0,28	0,2	0,1	0,17	0,15	0,08
resorbiertes, markiertes Protein [mg] /ml	0,04	0,05	0,05	0,02	0,04	0,04
Fraktion 1 [$\text{mg} \times 10^{-3}$ /ml] (großmolekular)	2,92	2,70	1,55	1,46	2,16	1,24
Fraktion 1 x 100 ges., mark. resorb. Prot. [%]	7,3	5,4	3,1	7,3	5,4	3,1

Tab. 8 Vergleich zwischen oral verabreichter PGG-Menge und enteral resorbierter Proteinmenge nach einer bzw. sechs Stunden

Zur Verdeutlichung sind in Abb. 4 die Fraktionen der enteral resorbierten Proteine, bezogen auf die unterschiedlichen oral verabreichten Mengen ^{131}J PGG einander gegenübergestellt.

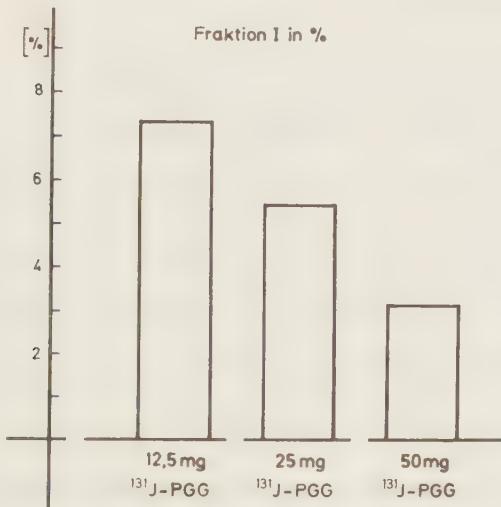


Abb. 4 Enteral resorbierte Proteinmenge (nur Fraktion 1)
als Funktion der oral aufgenommenen Menge an ^{131}J PGG

Auch hier zeigte sich eine Abhängigkeit in Bezug auf die applizierte Dosis. Je größer die Dosis, desto kleiner ist der relative Anteil an großmolekularen Proteinen, der resorbiert wurde.

4.4. Auswirkung auf die Eiweißverdauung nach mechanischer Unterbindung der sekretorischen Pankreasenzyme

Bei den bisher durchgeführten Versuchen wurden die Verdauungsenzyme völlig außer acht gelassen. Die Bedeutung der sekretorischen Pankreasenzyme für die Verdauung ist aber mit entscheidend. Deshalb ist es unerlässlich, ihr funktionelles Gewicht bei der Verdauung und damit der enteralen Resorption von Proteinen zu untersuchen. Aus diesem Grunde wurde in den nachfolgenden Versuchen die sekretorische Aktivität des Pankreas stark vermindert, indem die Pankreasausführgänge durch Legen von Ligaturen kurz vor der Papilla Vateri soweit als möglich unterbunden wurden. Bei diesen Versuchen wurde den Ratten ^{131}J -markiertes Pferdegammaglobulin intraduodenal, nach der Papilla Vateri direkt in das Darmlumen verabreicht. Die Ergebnisse der dabei auftretenden Restaktivitäten wurden mit denen verglichen, die bei nicht unterbundenem ductus pancreaticus im Dünn- bzw. Dickdarm gemessen wurden. Zusätzlich wurden Blutuntersuchungen vorgenommen, wodurch der groß- bzw. kleinemolekulare Anteil nach der Resorption im Serum bestimmt wurde (siehe Tab. 9 , 10).

Zu Beginn der Versuche wurde von 1,5 ml ^{125}J PGG (entspricht der applizierten Dosis) die Impulsrate bestimmt.

Sie ergab 2.115.690 cpm. In diesen 1,5 ml ^{125}J PGG sind 37,5 mg markiertes PGG enthalten.

	Dünndarm %appl.D.	Dickdarm %appl.D.	Serum %/ml	Fraktion1 %/mg
Ratte 1	22,27	0,34	0,14	46,88
Ratte 2	25,24	0,48	0,18	55,83
Ratte 3	20,95	0,44	0,14	38,71
Ratte 4	49,23	0,22	0,11	66,27
$\bar{x}$	29,43	0,37	0,14	51,92
$S\bar{x}$	$\pm 6,66$	$\pm 0,06$	$\pm 0,01$	$\pm 5,82$

Tab.9 Relative Restaktivitäten und relative Blutaktivitäten bei Unterbindung des Überganges von Duodenum zum Jejunum (% der applizierten Dosis pro Gesamtorgan bzw. pro 1 ml Serum)

	Dünndarm %appl.D.	Dickdarm %appl.D.	Serum %/ml	Fraktion1 %/mg
Ratte 1	6,16	0,60	0,22	55,16
Ratte 2	13,59	0,72	0,24	40,89
Ratte 3	15,61	0,93	0,28	43,53
Ratte 4	13,44	0,75	0,25	37,11
Ratte 5	6,11	(13,37)	0,17	42,66
$\bar{x}$	10,98	0,75	0,23	43,87
$S\bar{x}$	$\pm 2,02$	$\pm 0,07$	$\pm 0,02$	$\pm 3,03$

Tab.10 Relative Restaktivitäten und relative Blutaktivitäten ohne Unterbindung des Überganges von Duodenum zum Jejunum (% der applizierten Dosis pro Gesamtorgan bzw. pro 1 ml Serum)

Die Meßergebnisse zeigen erwartungsgemäß, mit Ausnahme des Dickdarms, bei mechanischer Unterbindung des Übergangs von Duodenum zum Jejunum eine fast 3 x so hohe relative Rest-

aktivität im Dünndarm. Diese Werte unterscheiden sich signifikant in beiden Gruppen, wobei im Dünndarm nach der Unterbindung höhere Werte gefunden werden als ohne Unterbindung, im Dickdarm jedoch die Relationen genau umgekehrt sind.

Interessant erscheint nun die Frage, ob bei reduzierter Resorption der Anteil an großmolekularem PGG sich nach der Darmwandpassage verändert oder gleichbleibt. Wie die Abb. 5 zeigt, bestehen große Unterschiede bezüglich der großmolekularen Fraktion 1 nach Radiochromatographie zwischen beiden Gruppen. Die Unterbindung des ductus pancreaticus bewirkt zwar eine verminderte Resorptionsrate, jedoch einen größeren Anteil in Fraktion 1. Die operative Enzymverminderung im Magen-Darm-Trakt bewirkt somit einerseits eine Verminderung des enzymatischen Abbaus von Proteinen, andererseits aber auch eine Zunahme von großmolekularen Fremdproteinen im Blut.

Das in Abb. 6 dargestellte Ergebnis war zu erwarten, da bei mechanischer Einschränkung der Sekretion von Verdauungsenzymen des Pankreas damit zu rechnen ist, daß aufgrund der damit verbundenen Verringerung von proteolytischen Enzymen ein höherer Prozentsatz großmolekularer, also ungespaltener Proteine enteral resorbiert wird.

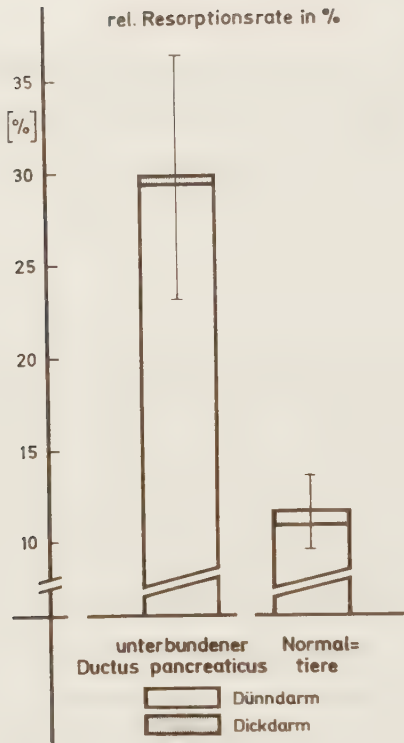


Abb. 5 Relative Resorptionsrate im Dün- bzw. Dickdarm nach intraduodenaler Applikation von 37,5 mg ^{125}J PGG bei unterbundenem ductus pancreaticus und bei normalen Tieren

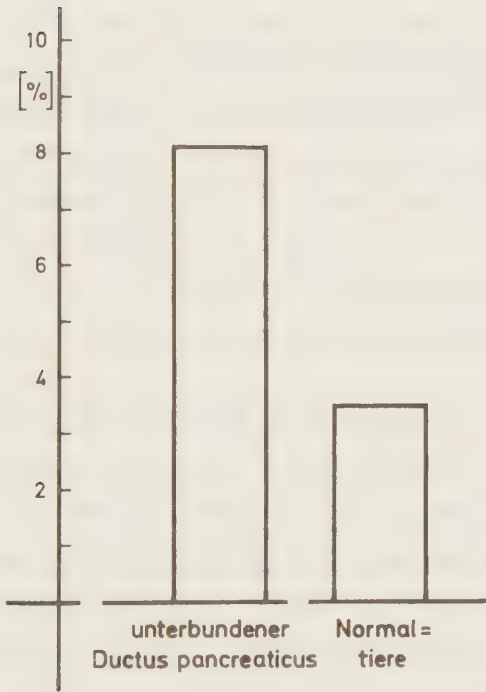


Abb. 6 Fraktion 1 (Menge der resorbierten, radioaktiv markierten, großmolekularen Proteine, die durch die Anwendung der Sephadex-Gel-Chromatographie - G-25 - bestimmt wurde), bei unterbundenem und nicht unterbundenem ductus pancreaticus

4.5. Pharmakologischer Einfluß auf die Verdauungsenzyme bei Eiweißverdauung durch EDTA und Trasylol

Eine andere Möglichkeit, die Wirkung der sekretorischen Pankreasenzyme zu reduzieren, besteht auf pharmakologischem Wege. EDTA (Titriplex II) ist eine chemische Verbindung, die die für die Funktion der sekretorischen Pankreasenzyme unerläßlichen Spurenelemente komplex bindet und damit die Aktivierung der Enzyme verhindert.

Die sekretorischen Pankreasenzyme benötigen für ihre Verdauungsfunktion Spurenelemente (26). Ein Entzug dieser Spurenelemente aus dem Darmlumen hat demnach eine Minderung der Enzymaktivität zur Folge. Um die Resorption von großmolekularen Proteinen zu steigern, wurde EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure) verwendet, weil diese Verbindung in der Lage ist, mit Metallen ein Chelat zu bilden (siehe Abb. 7).

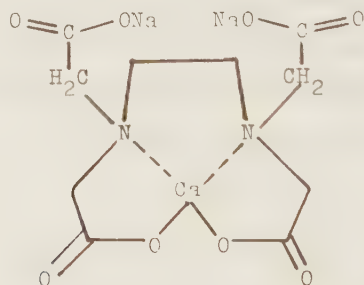


Abb. 7 Calciumedetate-Natrium (31)

Demzufolge muß eine orale Gabe von Titriplex II eine starke Verminderung der für die Enzymaktivität notwendigen Spurenelemente im Darmlumen bewirken. Greift man Calcium-Ionen als Beispiel heraus, so wird durch die Verwendung von EDTA das Calcium entionisiert und in dieser Form beschleunigt ausgeschieden .

Eine weitere pharmakologische Möglichkeit einer spezifischen Enzymhemmung mit dem Ziel, den Eiweißabbau im Magen-Darm-Trakt zu reduzieren, besteht in der Hemmung von Trypsin mit Trasylol.

1936 isolierte M. KUNITZ (14) aus dem Rinderpankreas einen basischen Trypsininhibitor, das Trasylol. Um die Trypsinaktivität bei der Proteinspaltung im Darm spezifisch zu hemmen (30), wurde in einigen Versuchsgruppen Trasylol eingesetzt. Dieser Trypsininhibitor ist nicht identisch mit dem streng monospezifischen Trypsininhibitor, der im Pankreas aller Säugetiere vorkommt.

Nach HUBER (28) ist das Trasylolmolekül birnenförmig, wobei der Lysin-15-Rest extrem an der Spitze des Moleküls zu liegen kommt. Auffallend ist dabei, daß sich die meisten positiv geladenen, d.h. basischen Aminosäuren, in der oberen Hälfte des Moleküls befinden, während die sauren,

negativ geladenen räumlich entgegengesetzt liegen. Daraus ergibt sich, daß das Trasylolmolekül ein sehr hohes Dipolmoment besitzt, was eine überaus schnelle Orientierung des Trasylols zum aktiven Zentrums des Trypsins sicherstellt. Hydrophobe Effekte und Salzbrücken sind für die gegenseitige Wirkung von Trasylol und Trypsin von entscheidender Bedeutung, denn sie begründen die hohe Affinität zueinander.

Die Bindung zwischen Trasylol und Trypsin ist permanent, d.h. es tritt keine Spaltung einer Peptidbindung ein, wie es bei vielen anderen Trypsininhibitoren der Fall ist. In einem sauren Milieu wird jedoch der Komplex zwischen Trasylol und Trypsin wieder in die Ausgangsprodukte zerlegt, d.h. im alkalischen Milieu des Duodenums bleibt das Trypsin an das Trasylol gebunden und ist damit proteolytisch unwirksam.

Wenn also, wie in den nachfolgenden enteralen Resorptionsversuchen bei Ratten, das vom Pankreas sezernierte Trypsin inaktiviert werden soll, so ist lediglich darauf zu achten, daß das Verhältnis Trypsin zu Trasylol zugunsten des Trasylol verschoben werden muß.

Die Meßergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 11 aufgeführt. Zur besseren Übersicht sind die arithmetischen Mittelwerte der Resorptionsraten bei unbehandelten Tieren, bei Tieren mit EDTA bzw. Trasylol + EDTA in Abb. 8 dargestellt.

	Radioakt./ml i.% appl.D. n. 6 h	Fraktion I %/mg	Fraktion I %/mg
unbehand. Ratten	0,12	2,7	1,3
Ratten mit EDTA	0,18	4,4	3,16
Ratten mit EDTA + Trasylol	0,11	3,7	1,70

Tab.11 Relative enterale Proteinresorption mit und ohne pharmakologische Behandlung mittels EDTA bzw. Trasylol

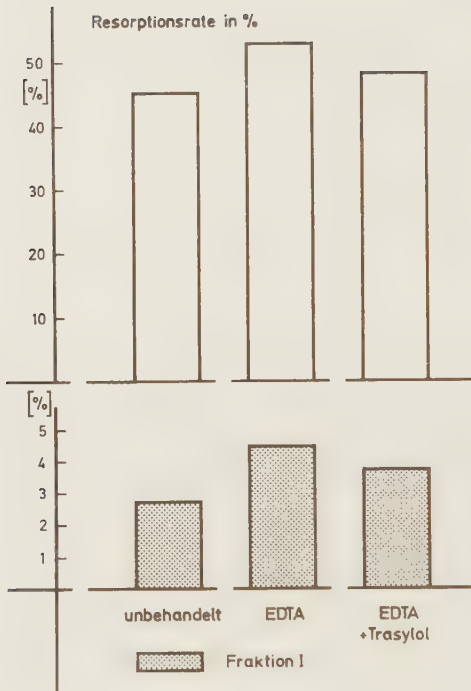


Abb. 8 Enterale Resorptionsrate von oral aufgenommenem Protein bei Ratten mit und ohne pharmakologische Behandlung durch EDTA bzw. Trasylol und deren Anteil an Fraktion I

Vergleicht man die Resorptionsraten von Kontrolltieren mit Tieren, die zusätzlich EDTA bzw. Trasylol + EDTA bekamen, so ergeben sich keine augenfälligen Unterschiede.

Betrachtet man jedoch die Radioaktivität im Serum 6 Stunden nach der oralen Applikation mit den Chromatographieergebnissen, so fällt auf, daß man durch die pharmakologische Enzymhemmung doch einen größeren Prozentsatz an großmolekularen Proteinen durch die Darmwand hindurchbringt. So steigt der prozentuale Anteil der Fraktion 1 von 2,7 % bei Kontrolltieren auf 3,7 % bzw. 4,4 % nach pharmakologischer Enzymhemmung (siehe Tab. 11).

4.6. Beeinflussung der Mucosopermeabilität des Verdauungstraktes für Proteine nach oraler Gabe von Aspirin
Eine weitere Möglichkeit, die enterale Resorption von oral aufgenommenen Proteinen zu steigern, würde nun durch eine Erhöhung der Permeabilität der Mucosa des Verdauungstraktes untersucht. SEIFERT (40) stellte fest, daß dies durch die Anwendung von Harnstoff möglich ist.

Aspirin (Essigsäureester der Salicylsäure) ist ein häufig angewendetes Pharmakon, dessen gesamte Wirkungen

an dieser Stelle nicht diskutiert werden sollen.

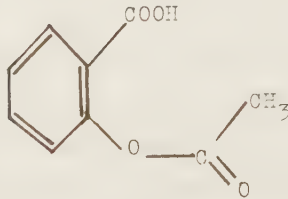


Abb.9 Acetylsalicylicum (Aspirin)

Für diese Untersuchungen an den Ratten, bezüglich der enteralen Resorption von Proteinen, ist die permeabilitätssteigernde Wirkung an der Darmmucosa durch Aspirin wesentlich. Aspirin liegt im sauren Milieu in überwiegend undissoziierter Form, relativ gut lipidlöslich vor und bewirkt in dieser Form eine Permeabilitätssteigerung der Mucosa. Der genaue Mechanismus dieser Permeabilitätserhöhung ist bis heute nicht bekannt. Nach G. FLEMSTRÖM (21) und anderen Autoren (2) soll die Gegenwart von undissoziiertem Aspirin möglicherweise eine Permeabilitätssteigerung des "Molekularsiebs" (Mucosa) bewirken.

Das Aspirin selbst diffundiert im undissoziierten Zustand sehr leicht in die Schleimhautzellen, wo es aufgrund des dort herrschenden höheren pH-Wertes als im Darmlumen dissoziiert wird (pK des Aspirins : 3,8). Durch diesen Mechanismus wird für die Diffusion des Aspirins ein hoher Konzentrationsgradient aufrecht erhalten, was die Aufnahme des Aspirins vom Lumen in die Mucosazelle stark beschleunigt. Diese Zunahme der Permeabilität für Nichtelektrolyte macht vermutlich mit zunehmender elektrischer Leitfähigkeit eine Senkung der elektrischen Diffusionsschranke wahrscheinlich, was sich eventuell als Permeabilitätserhöhung der Mucosa auswirkt.

Neben diesen Wirkungen des Aspirins, die den Anstoß zur Anwendung in den Rattenversuchen gab, gibt es noch etliche unerwünschte Nebenwirkungen wie z.B. Blutungsneigung, schädliche Wirkung auf die Magenmucosa, Ursprung für allergische Reaktionen, Erhöhung intrazellulärer Osmolarität mit anschließender Vergrößerung der Zellen und der Möglichkeit von daraus resultierenden Ulcera.

Dieses Anschwellen der Zellen wird von FLEMSTRÖM (21) ebenso als eine mögliche Ursache für die Permeabilitätserhöhung der Mucosa angesehen.

In 3 ml handwarmer, physiologischer Kochsalzlösung wurden 0,03 g Aspirin gelöst und den Ratten oral, zusammen mit 1 ml PGG verabreicht. Darüberhinaus wurde ein analoger Kontrollversuch ohne Gabe von Aspirin durchgeführt.

Die Konzentration der Radioaktivität des gleichzeitig applizierten ^{131}J PGG (25 mg PGG) betrug 546160 cpm. In diesem Versuch wurde zusätzlich die Organverteilung des oral aufgenommenen bzw. des resorbierten, markierten Proteins 6 Stunden nach der Applikation bestimmt. Dazu standen pro Versuch 5 Ratten zur Verfügung. Von besonderem Interesse dürfte bei diesen Untersuchungen die Schilddrüse sein, da zur Bildung des Schilddrüsenhormons Jod unerlässlich ist und das oral verabreichte Protein (PGG) mit ^{131}J markiert wurde. Wenn dieses Jod vom PGG abgespalten wird, kann man annehmen, daß es hauptsächlich in der Thyreoidea abgelagert wird. Somit ist die Radioaktivität in diesem Organ Indikator für den enzymatischen Abbau. Entsprechend wie bei den Restaktivitätsbestimmungen im Magen-Darm-Trakt wurden auch hier die absoluten und spezifischen Radioaktivitäten gemessen bzw. errechnet.

Die sich daraus ergebenden relativen spezifischen Restaktivitäten sind mit ihren arithmetischen Mittelwerten (die Versuche wurden jeweils an 5 Ratten durchgeführt) in den Tab. 12, 13 angegeben.

	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	Ratte 5	$\bar{x}$	$S\bar{x}$
Dünndarm	3,96	6,69	4,11	5,51	7,08	5,47	$\pm 0,64$
Dickdarm	3,34	2,47	2,79	2,21	3,59	2,88	$\pm 0,26$
Magen	13,28	44,98	26,46	22,04	24,98	26,35	$\pm 5,19$
Gesamt	20,58	54,14	53,36	29,76	35,65	38,7	$\pm 6,6$

Tab.12 Radioaktivität (cpm i. % appl.D./Org.) im
Magen-Darm-Trakt nach oraler Gabe von 1 ml
 ^{131}J PGG nach 6 Stunden

		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	Ratte 5	$\bar{x}$	$s_{\bar{y}}$
Gruppe II: mit Aspirin behandelt	Dünndarm	9,28	7,96	4,97	6,95	4,43	$6,72 \pm 0,91$	
	Dickdarm	3,74	4,93	2,95	4,81	3,7	$4,03 \pm 0,37$	
	Magen	57,68	44,61	61,45	54,86	63,29	$56,38 \pm 3,29$	
	Gesamt	70,70	57,5	69,37	66,61	71,44	$67,12 \pm 2,54$	

Tab. 13 Radioaktivität (cpm i. % appl. D./Org.) im
Magen-Darm-Trakt nach oraler Gabe von 0,03 g
Aspirin und 1 ml ^{131}J PGG nach 6 Stunden

Entgegen den Erwartungen war die Restaktivität im Magen-Darm-Trakt bei zusätzlicher Gabe von Aspirin (siehe Tab.13) höher als unter Normalbedingungen (siehe Tab.12). Das bedeutet, daß innerhalb von 6 Stunden mit Aspirin weniger

Pferdegammaglobulin resorbiert wurde als ohne Aspirinzusatz.

Von besonderem Interesse bei den vorher dargestellten Resorptionsverhalten ist der großmolekulare Anteil von PGG nach der Resorption (Fraktion I).

SERUMAKTIVITÄT		Ratten m. Aspirin	Ratten o. Aspirin
	Fraktion 1 cpm	4194	4095
	Fraktion 1 %	9,1	7,4
	Fraktion 2 cpm	42115	51212
	Fraktion 2 %	90,9	92,6

Tab.14 Verteilung der Fraktion I bzw. der Fraktion II am enteral resorbierten Protein nach oraler Gabe von 1 ml ^{131}J PGG mit und ohne Zusatzbehandlung durch 0,03 g Aspirin

Es fällt auf, daß mit Aspirin mehr großmolekulare Proteine die Darmwand passieren, als ohne Aspirinzusatz (siehe Tab. 14). Zwar ist der Unterschied nicht sehr groß bei der Beurteilung der Auftrennung zwischen großmolekularem PGG und Spaltprodukten, hilft jedoch, die Konzentration der Radioaktivität in der Schilddrüse (siehe Abb. 10). Der Abbildung ist zu entnehmen, daß wesentlich mehr Radioaktivität in der Schilddrüse zu finden ist, wenn man den Aspirinzusatz wegläßt. Daraus und aus den Chromatographiebefunden kann man folgern, daß Aspirin die enzymatische Degradierung von PGG vermindert.

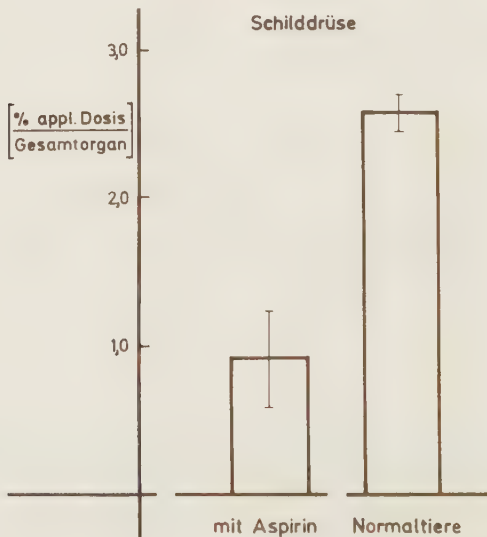


Abb. 10 Menge des enteral resorbierten PGG in der Schilddrüse nach 6 Std. (mit und ohne Gabe v. 0,03 g Aspirin)

In der Abb. 11 ist die Organverteilung in % der applizierten Dosis von den restlichen untersuchten Organen graphisch dargestellt und zwar bezogen auf 1 g Gewebe nach 6 Stunden.



Abb. 11 Radioaktivität in % der applizierten Dosis pro Gramm Gewebe in den restlichen untersuchten Organen nach 6 Stunden mit und ohne Aspirin

4.7. Untersuchung der pathologischen Einflüsse von EDTA, Trasylol und PGG

Alle Ergebnisse sind nicht aussagekräftig, wenn sich nach der Applikation von Protein oder den verwendeten Medikamenten herausstellt, daß schwerwiegende Organ- oder Gewichtsveränderungen die Folge waren. Aus diesem Grunde wurden zusätzlich Versuche unternommen, wobei man den Ratten täglich 100 mg EDTA bzw. 0,03 g Aspirin, Substanzen, von denen man am ehesten toxische Nebenwirkungen erwarten kann, oral zuführte und gleichzeitig das Körpergewicht jeden zweiten Tag kontrollierte. Nebenbei fand noch ein Kontrollversuch ohne zusätzliche Applikation statt (siehe Tab.15).

Um die Auswirkungen der pharmakologischen Behandlung mit EDTA und Aspirin auf die Rattengewichte über die Versuchsdauer zu verdeutlichen, werden die mittleren Körpergewichte der einzelnen Versuchsgruppen in Abb.12 dargestellt. Die Tab.15 gibt dazu die Einzelwerte bzw. die Differenz zwischen dem 1. und 13. Versuchstag an.

Die bisherigen Versuchsergebnisse haben gezeigt, daß sich die Resorption von großmolekularen Fremdproteinen aus dem Magen-Darm-Trakt durch verschiedene Manipulationen steigern läßt. Auch der Anteil an großmolekularem

	Tag	1.	3.	5.	7.	9.	11.	13.	Diff. 1.-13.
mit EDTA behandelt	Ratte 1	290	306	323	333	355	366	369	+ 79
	Ratte 2	307	325	347	358	380	393	396	+ 89
	Ratte 3	305	325	338	348	375	385	388	+ 83
	Ratte 4	303	315	327	335	348	356	359	+ 56
	Ratte 5	312	265	256	223	205	245	256	- 62
	$\bar{x}$	304,6	309,2	318,2	319,4	332,6	349,0	353,6	76,75 $\pm$ 7,22
mit Aspirin behandelt	Ratte 1	301	323	324	338	365	372	378	+ 77
	Ratte 2	320	279	265	243	226	215	208	- 112
	Ratte 3	300	317	328	333	346	345	355	+ 55
	Ratte 4	315	330	340	355	367	378	390	+ 75
	Ratte 5	301	312	311	312	320	315	318	+ 17
	$\bar{x}$	307,4	312,2	313,6	316,2	324,8	325,0	329,8	56,00 $\pm$ 13,9
unbehandelt	Ratte 1	413	400	410	425	450	460	468	+ 55
	Ratte 2	406	400	410	422	425	438	455	+ 49
	Ratte 3	406	411	420	445	465	475	474	+ 68
	Ratte 4	395	392	411	420	448	456	473	+ 78
	Ratte 5	414	345	323	290	268	255	249	- 165
	$\bar{x}$	406,8	389,6	394,8	400,4	411,2	416,8	423,8	62,5 $\pm$ 6,5

Tab. 15 Gewichte von unbehandelten bzw. täglich mit 0,03 g Aspirin bzw. 100 mg EDTA behandelten Ratten, gemessen in zweitägigem Abstand

Fremdprotein im Serum ist durch die eine oder andere Maßnahme erhöht worden. Die verwendeten Substanzen haben, wenn überhaupt, nur eine zu vernachlässigende Toxizität. Diese Ergebnisse führten zu der Überlegung, daß damit auch die Resorption nach oraler Verabreichung gesteigert und

damit der immunsuppressive Effekt verbessert werden kann. Deswegen wurden unter ähnlichen Bedingungen, wie bei den Resorptionsversuchen, auch Hauttransplantationen durchgeführt, wobei ALS mit den verschiedenen Pharmaka kombiniert wurde.

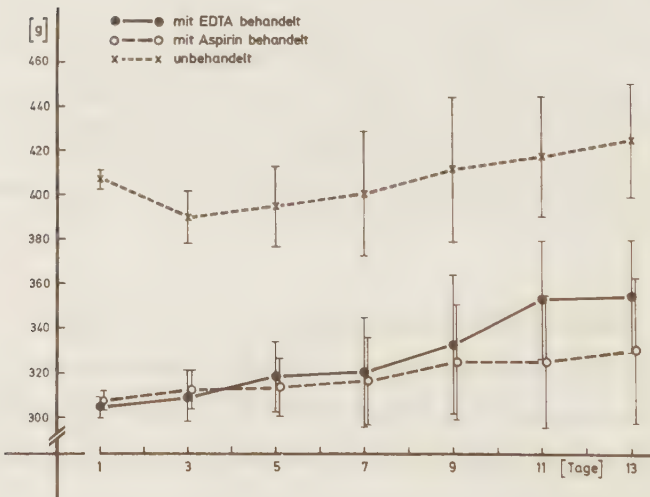


Abb. 12 Mittelwerte der Gewichte von unbehandelten bzw. tägl. mit 0,03 g Aspirin bzw. 100 mg EDTA behandelten Ratten, gemessen in zweitägigem Abstand

4.8. Verlängerung von allogenen Hauttransplantations- Überlebenszeiten nach oraler Gabe von ALS, Aspirin, Trasyolol und EDTA

ALS ist ein Medikament, das eine sehr starke immunsuppressive Wirkung entfalten kann (11, 12, 13, 15). Das Prinzip beruht darauf, daß durch Immunisierung mit Lymphozyten ein Antikörper gebildet wird, der in der Lage ist, die peripheren zirkulierenden Lymphozyten sowohl zu agglutinieren als auch zu zerstören. Da die Lymphozyten zu den immunkompetenten Zellen gerechnet werden müssen und damit bei jeder Immunabwehr, also auch bei der Transplantatabstoßung, eine Rolle spielen, muß sich eine Verminderung dieser immunkompetenten Zellen als Immunsuppression auswirken. Abgesehen von diesem Wirkungsprinzip gibt es noch eine ganze Reihe von Theorien, wodurch ebenfalls, aber auf anderem Wege, eine verzögerte Transplantatabstoßung nach ALS-Gabe erklärt werden kann (15). Die Wirksamkeit des ALS soll nach BRENDEL und Mitarbeitern (15) abhängig sein vom zytotoxischen Effekt, der gegen die Lymphozyten gerichtet ist. Deswegen wurde für die vorliegenden Experimente ein Serum mit einem relativ hohen lymphozytotoxischen Titer verwendet. Weiterhin wurde darauf geachtet, daß unerwünschte z.B. gegen Erythrozyten gerichtete Titer durch mehrmalige Absorption beseitigt wurden.

SEIFERT (38) zeigte, daß auch eine orale Applikation von ALS die Überlebenszeit von Hauttransplantaten bei Ratten verlängert. Die von ihm täglich verabreichte Dosis betrug 1 ml. Sie ergab eine Transplantatüberlebenszeit von $26,5 \pm 1,9$ Tage. Ein weiterer Versuch, bei dem 1 ml ALS nicht täglich, sondern nur am 1., 3. und 5. Tag verabreicht wurde, ergab eine Veränderung der Überlebenszeit auf $23,4 \pm 1,8$ Tage - also kein signifikanter Unterschied zum erstgenannten Versuch. Dieses Ergebnis ließ vermuten, daß eine Dosissteigerung auch mit einer Verbesserung des Transplantationsergebnisses verbunden ist. Aus diesem Grunde war es naheliegend, die Transplantatüberlebenszeit bei einer wesentlich höheren, täglich oral verabreichten Dosis zu untersuchen. Deswegen wurden täglich 5 ml ALS oral appliziert. Wie Tab.17 zeigt, ergab sich diesmal eine Transplantationsüberlebenszeit von $21,25 \pm 2,75$ Tagen. Dies bedeutet, daß eine drastische Steigerung der Dosis zu keiner Verbesserung der Transplantatüberlebenszeit führt.

Trotzdem soll nicht unerwähnt bleiben, daß die Transplantatüberlebenszeit nach oraler Applikation von ALS, gleichgültig welche Dosis verabreicht wurde, gegenüber unbehandelten Kontrolltieren um ca. das Doppelte verlängert war.

Nachdem geklärt worden ist, welchen Effekt ALS nach oraler Applikation auf die Transplantation von allogener Rattenhaut hat, wurde nun untersucht, ob sich die immunsuppressive Wirksamkeit von ALS durch pharmakologische Zusätze, welche auf die Resorption von inaktiven Fremdproteinen Einfluß nehmen, steigern läßt.

tägl. 1 ml ALS + 0,03 g Aspirin	n = 8	$\bar{x} = 17,38 \pm 1,03$
tägl. 0,03 g Aspirin	n = 10	$\bar{x} = 19,8 \pm 0,4$
tägl. 0,06 g Aspirin	n = 10	$\bar{x} = 19,1 \pm 0,41$
tägl. 1 ml ALS + 100000 KIF Trasylo1	n = 4	$\bar{x} = 15,5 \pm 0,5$
tägl. 100000 KIF Trasylo1	n = 7	$\bar{x} = 15,29 \pm 0,84$
tägl. 100 mg EDTA	n = 8	$\bar{x} = 18,5 \pm 1,83$

Tab. 16 Allogene Hauttransplantationsüberlebenszeiten nach täglicher, oraler Applikation der in der Tabelle angegebenen Pharmaka

Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 16 in Form von Mittelwerten und mittlerem Fehler des Mittelwertes zusammengefaßt. Es wird deutlich, daß die einzelnen Pharmaka allein schon die Überlebenszeit von Hauttransplantaten verlängern können. So findet man nach der Applikation von 100 mg EDTA bzw. 0,03 g Aspirin durchschnittliche Überlebenszeiten, wie sie auch nach oraler Applikation von ALS gefunden werden. Die Kombination von ALS bzw. Trasylol erbringt keine Verbesserung der Hauttransplantationsüberlebenszeiten, im Gegenteil, es scheint sogar die immunsuppressiven Wirkungen der einzelnen Substanzen durch deren Kombination einzuschränken. Somit kann man aus einer verbesserten Resorption von ALS nicht auf eine verlängerte Hauttransplantation schließen.

unbehandelt	n= 14	$10 \pm 0,2 \text{ d}$
1 ml ALS täglich	n = 9	$26,5 \pm 1,9 \text{ d}$
1 ml ALS 1.,3.,5. Tag	n = 10	$23,4 \pm 1,8 \text{ d}$
5 ml ALS täglich	n = 4	$21,2 \pm 2,7 \text{ d}$

Tab. 17 Hauttransplantationsüberlebenszeiten bei Ratten bei unterschiedlichen, oral applizierten ALS-Dosen im 1-Tages- und 2-Tagesabstand

5. Diskussion

Aus der Vielfalt der Ergebnisse sollen nur einige herausgegriffen und diskutiert werden. So

- soll die Tatsache, daß fremde Proteine über den Magen-Darm-Trakt in den Organismus gelangen, kritisch betrachtet werden;
- muß die Steigerung der Resorptionsrate durch verschiedenste pharmakologische Beeinflussung des Magen-Darm-Traktes erörtert werden;
- muß überlegt werden, warum die Transplantationsergebnisse trotz resorptionssteigernder Maßnahmen nach oraler Applikation von ALS nicht verbessert werden konnten.

Wenn man sich mit der Frage beschäftigt, wie gelangen Fremdproteine in den Organismus, so erscheint es wohl am zweckmäßigsten, zunächst die Anatomie der Mucosazellen zu untersuchen. Betrachtet man die Feinstruktur der Basalzelle vom Darmepithel, so sind zwei Wege für die Resorption von großmolekularen Fremdproteinen nach enteraler Applikation denkbar (32). Die erste Möglichkeit ist die Aufnahme der Proteine aus dem Darmlumen in das Zytoplasma der Mucosazelle und in Form von Vakuolen die darauffolgende Abgabe in Lymph- bzw. Blutgefäße (10). Die zweite Möglichkeit ist der "Durchtritt" des Proteins vom Darmlumen in die Lymph- bzw. Blutbahn durch den Interzellularspalt (3).

Es ist denkbar, daß die enterale Resorption großmolekularer, immunogener Proteine auch von einer Persorption (42, 43) durch die Darmwand begleitet wird, die ihre Ursache in einer Pinozytose haben. Eine Schädigung der Mucosazellen aufgrund von im Darmlumen befindlichen Toxinen ist ebenfalls denkbar und könnte zu einer vermehrten Durchlässigkeit führen.

BRAMBELL (10) und LEAK (32) erbrachten den elektronenmikroskopischen Nachweis, daß bei Neugeborenen eine Gammaglobulin-Resorption in der Darmmucosa stattfindet. Nachdem diese Gammaglobuline auch im Blut der Neugeborenen nachgewiesen werden konnten, wurde diskutiert, ob es nicht spezielle Rezeptoren an den Basalzellen gibt, die die für die Verdauung kennzeichnende enzymatische Eiweißspaltung verhindern. Bis heute ist die Frage, ob dieser Mechanismus auch für alle möglichen anderen Proteine zutrifft und ob dies auch auf Erwachsene bezogen werden kann, ungeklärt. Sollte die Theorie spezifischer Proteinrezeptoren an den Mucosabasalzellen eine allgemeine Gültigkeit haben, so schließt sich daran unmittelbar die Frage an: wie werden diese Proteine an den korrespondierenden Rezeptorkomplex gebunden und welche Mechanismen oder Intrazellulärstrukturen ermöglichen nach dem Durchtritt des Fremdproteins durch die Zelle die Abspaltung des Pro-

teins von seinem Rezeptor ohne das Protein so zu verändern, daß es seine biologischen Funktionen verliert. Leider ist bis heute der Einblick in die makromolekularen intrazellulären Vorgänge in vivo nicht möglich, weshalb diese Frage vorläufig unbeantwortet bleiben muß.

Die Anwendung der Radiochromatographie zur Analyse des Serumeiweißes zeigte nach dem Durchtritt durch die Darmwand zwei Proteinfractionen (siehe Tab. 5 - 7). Für den Fall, daß resorbiertes Eiweiß nach dem Passieren der Darmmucosa im Serum nicht in der Form vorliegt, wie es sich im Darmlumen befand, sondern beispielsweise an eine Trägersubstanz komplex gebunden im Blut zirkuliert, so müßte die Analyse der Radiochromatographie nicht nur zwei, sondern mindestens drei Peaks liefern bzw. der Peak, der großmolekulare Proteine enthält, müßte verbreitert sein. Ein hypothetischer Protein-Transport-Komplex, da er ein höheres Molekulargewicht hätte als das verwendete PGG, müßte in diesem Fall als vorlaufender Peak vor der Fraktion I auftreten. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. Aus diesem Grunde kann man annehmen, daß das immunogene, enteral verabreichte und anschließend resorbierte, großmolekulare Protein in seiner ursprünglichen Form im Blut zirkuliert.

Durch Präzipitationstests mit der Doppeldiffusionsmethode im Agargel und einem spezifischen Antipferdeserum konnte gezeigt werden, daß die Antigeneigenschaften von resorbierten, großmolekularen Pferdeproteinen im Blut des "Wirtstieres" die gleichen sind, wie vor ihrer enteralen Resorption (40). Das bedeutet, daß die immunologischen Eigenschaften bei der Resorption nicht verloren gegangen sind.

Für neugeborene Säuglinge ist die Tatsache anerkannt, daß mütterliche Gammaglobuline aus dem Darm resorbiert werden können. So hat ASQUITH (3, 18, 27) durch elektrooptische Untersuchungen nachgewiesen, daß mütterliche Gammaglobuline durch die Interzellularspalten des Darmepithels hindurchtreten können. Ob dieser Transportmechanismus auch für die Erwachsenen gültig ist oder durch die sich erst später entwickelnde enzymatische Aktivität des Magen-Darm-Traktes überdeckt wird, ist noch unbekannt, ebenso wie die Mechanismen, die zu der Permeation des Proteins durch die Interzellularspalten führen.

BIENENSTOCK (7), COOPER (19) und FREY (25) beschrieben die Peyer'schen Plaques als Ein- und Austrittsort für rezirkulierende Lymphozyten. Lymphozyten sind Zellen des Retikuloendothelialsystems und haben u.a. ihre Bedeutung

als Trägerzellen sessiler Antikörper. Damit wäre es auch denkbar, daß sie als Trägerzellen für großmolekulare Fremdproteine fungieren und in dieser Weise für die enterale Resorption dieser Proteine zumindest mitverantwortlich sind. Die Peyer'schen Plaques grenzen sowohl an das Darmlumen als auch an die Lymphbahnen. SEIFERT (40) beschrieb jedoch Untersuchungen, in denen nach oraler Applikation von radioaktiv markierten, großmolekularen Proteinen die Restaktivitäten von Peyer'schen Plaques und verglichen dem Darmmucosagewebe keinen signifikanten Unterschied aufwiesen. Er folgerte daraus, daß Lymphozyten beim Resorptionsvorgang keine übergeordnete Stellung einnehmen oder die Peyer'schen Plaques lediglich als Lymphozytenreservoirs anzusehen sind, derart, daß sie Lymphozyten ins Darmlumen abgeben, die Rezirkulation der Lymphozyten jedoch auf anderem Wege zustande kommt.

Eine spezielle Eigenschaft bestimmter Lymphozyten ist, daß sie in der Lage sind, nach erstmaligem Kontakt mit einem spezifischen Antigen ein "Gedächtnis" zu entwickeln (26), weshalb man sie als Gedächtniszellen bezeichnet. Diese Fähigkeit ist für den Abwehrmechanismus des Organismus von ausschlaggebender Bedeutung. Nach einem zweiten Kontakt mit dem gleichen Antigen sind sie aufgrund ihres Gedächtnisses in der Lage, innerhalb kürzester Zeit darauf zu reagieren.

In dieser Beziehung können sie auch als Informationsvermittler für den gesamten Organismus verstanden werden, und u.U. dafür sorgen, daß gegen zugeführtes Fremdprotein nicht immunisiert wird, besonders, wenn es via Magen-Darm-Trakt resorbiert wird. Wenn diese These richtig ist, dann hätte möglicherweise die orale Antigengabe aus therapeutischen Überlegungen, z.B. zur immunologischen Suppression von Transplantatabstoßungsreaktionen oder von Unverträglichkeitsreaktionen, eine gravierende Bedeutung.

Auf diese Weise könnte bei einem Organismus auch eine immunologische Toleranz induziert werden. Man könnte das Phänomen der immunologischen Toleranz auch als Fähigkeit eines Organismus ansehen, körperfremdes Protein ohne Degradierung in körpereigenes umzuwandeln. Nachgewiesen ist, daß beim Menschen im Serum eine gewisse Quantität an Fremdproteinen vorkommt ohne Unverträglichkeitsreaktionen auszulösen. Diese Beobachtung läuft mit der Meinung von MITCHINSON (34) konform, daß die Induktion einer Toleranz nur in einem ganz bestimmten Dosisbereich möglich ist. Versuche, in denen Antigene in die Pfortader appliziert wurden, haben ergeben, daß diese Antigene nach der Leberpassage für den Organismus zu tolerogenen Proteinen geworden sind. Ob die Quantität dieser applizierten Dosis für die immuno-

gene Toleranz eine Rolle spielt, inwieweit sie vom Parameter der Zeit ihrer Applikation, von der Art der Medikation, vom Antigentyp, von der Quantität und Spezifität der Verdauungsenzyme nach oraler Applikation abhängt, ist eine Frage, die vor der therapeutischen Anwendung am Menschen im Tierexperiment zu erforschen ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur ein kleiner Teil dieses großen, überaus komplexen Problemkreises herausgegriffen und teilweise untersucht. Da fremde Proteine offensichtlich in bestimmten Dosen über den Magen-Darm-Trakt in den Organismus gelangen, muß die Frage gestellt werden, warum diese zu keiner allgemeinen Sensibilisierung führen. Normalerweise gelangen in einen Organismus über die Nahrung eine Vielfalt von pflanzlichen und tierischen Eiweißen. Wenn unter diesen Umständen für jedes dieser Proteine nach MITCHINSON (34) eine "Low-Zone"-Toleranz entstehen würde, dann könnte ein Organismus gegen diese Proteine nicht mehr sensibilisiert werden. Tatsache ist jedoch, daß z.B. ein menschlicher Organismus sehr wohl in der Lage ist, immunologisch auf die intravenöse Applikation von Kuhmilchproteinen zu reagieren, obwohl häufig Milch getrunken wird und danach Rinderproteine im Blut nachgewiesen werden. Somit erklärt eine "Low-Zone"-Toleranz nach MITCHINSON nicht die Tat-

sache, daß Fremdproteine auch in großmolekularer Form nach der Darmwandpassage vertragen werden. Wenn ein Grenzwert existiert, so ist die Frage nach dem Resteiweiß zu untersuchen.

Abschnitt 4.2., Abb. 3 zeigt, daß das Resteiweiß qualitativ komplementär zum enteral resorbierten ist.

Der Einfluß von sekretorischen Verdauungsenzymen des Pankreas sowie der Einfluß von Pharmaka auf die enterale Resorption ist für die Frage der Quantität der Resorption von großem Interesse. Deshalb ist in Abschnitt 4.4. der Einfluß der sekretorischen Pankreasfunktion auf die Quantität der Resorption bzw. des Resteiweißes untersucht worden. Aus Abb. 5 wird deutlich, daß bei Unterbindung des ductus pancreaticus sichtlich weniger PGG resorbiert, aber auch enzymatisch abgebaut wird. Abb. 6 zeigt, daß die großmolekulare, resorbierte Proteinfraction bei unterbundenem ductus pancreaticus wesentlich größer ist, als bei nicht unterbundenem. Der Mangel an Verdauungsenzymen läßt vermuten, daß sich ein höherer Prozentsatz an großmolekularen Proteinen im Darmlumen befindet. Daraus könnte man folgern, daß die Eiweißkonzentration im Lumen auch einen Parameter für die großmolekulare Proteinresorption darstellt. Das hätte zur Folge, daß bei größerer Proteinmenge mehr in

großmolekularer Form resorbiert wird. Die Ergebnisse der Abb. 5 zeigen jedoch, daß eine solche Abhängigkeit nicht vorhanden ist. Im Gegenteil, es wurde festgestellt, daß eine größere PGG-Menge (50 mg) schlechter resorbiert wird als eine kleine.

Dieses Resorptionsverhalten, wobei prozentual größere Mengen an großmolekularem PGG nach geringeren enteralen Dosen resorbiert werden, entsprach nicht den Erwartungen. Rechnet man jedoch die relativen Werte auf absolute Werte um, so erhält man einen ziemlich konstanten Betrag, der pro Tier und pro Zeit unabhängig von der Dosis aufgenommen wird. Möglicherweise kann dieses Resorptionsverhalten durch einen aktiven Transport, wie es bei Säuglingen beobachtet worden ist (10), erklärt werden. Es würde jedoch über den Rahmen dieser Arbeit gehen, diesen Resorptionsmechanismus weiter aufzuklären.

Eine Möglichkeit, die sekretorische Pankreasfunktion zu beeinflussen, ist der hemmende pharmakologische Einfluß von EDTA und Trasylol auf die Verdauungsenzyme. Die Ergebnisse in Abschnitt 4.5. zeigen ein ähnliches Resorptionsverhalten wie bei der mechanischen Verminderung der Pankreasenzyme durch Unterbindung des ductus pancreaticus.

Es konnte auch gezeigt werden, daß Aspirin einen Einfluß auf die Resorption von PGG hat. Man ersieht, daß nach oraler Gabe von Aspirin die enteralen, resorptiven Eigenschaften stets zunehmen, was auch die Organverteilungen bestätigen.

Alle durchgeführten pharmakologischen Manipulationen haben nur dann einen Sinn, wenn eine gravierende Toxizität ausgeschlossen werden kann. Dieser Ausschluß ist mit der Versuchsreihe Abschnitt 4.7. bewiesen worden.

Die Ergebnisse aus Abschnitt 4.8. zeigen eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit allogener Rattenhauttransplantate nach oraler Applikation von ALS. Man könnte vermuten, daß eine Quantitätssteigerung von oral appliziertem ALS eine zusätzliche Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit bewirkt. Die Ergebnisse, dargestellt in Tab. 17, zeigen, daß diese Vermutung nicht zutrifft. Es muß offensichtlich ein Grenzwert bestehen, dessen Überschreiten entweder eine Resorptionsminderung von ALS oder eine zunehmende Toxizität und damit Unverträglichkeitsreaktion herbeiführt. Daß die orale Gabe von ALS die Überlebenszeit heraufsetzt, ist verständlich, da es sich bei dem ALS um spezifisches Ratten-ALS handelt.

Die signifikante Verlängerung nach oraler Applikation von Aspirin, EDTA und Trasylol verwundert allerdings zunächst.

Aspirin hat neben einer Permeabilitätssteigerung der Magen-Darm-Mucosa eine antirheumatische und eine suppressive Wirkung auf die Thrombozytenagglutination. Enteral resorbiertes Aspirin (Acetylsalicylsäure) kreist einerseits als freie Salicylsäure, andererseits an Glykokoll oder Glucuronsäure gekoppelt im Blut. Eine Beeinflussung der Blutgerinnung über Prothrombin bzw. Thrombozyten könnte sich als heilungsfördernd an der Grenzfläche Transplantat/Operationswunde auswirken. Darüberhinaus sind u.a. Gerinnungsvorgänge bei der Transplantatabstoßung von Bedeutung. Bei eingeschränkter Blutgerinnung müßte somit eine Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit resultieren. Die Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit nach oraler Gabe von EDTA könnte man mit dem pharmakologischen Wirkungsmechanismus von EDTA erklären. Bei der Abstoßung eines Transplantates sind, abgesehen von potenten Immunmechanismen, sicherlich auch Enzyme mitbeteiligt. Da EDTA durch Bindung von Metallionen in der Lage ist, die Enzymwirkung zu hemmen, könnte damit die beobachtete Transplantatverlängerung erklärt werden.

In gleicher Weise könnte man auch die Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit durch die orale Gabe von Trasylol interpretieren.

Augenfällig sind weiterhin die wesentlich kürzeren Überlebenszeiten nach oraler Gabe von 1 ml ALS + 100.000 KIE Trasylol sowie von 1 ml ALS + 0,03 g Aspirin im Vergleich zu 1 ml ALS allein. Dieses Ergebnis wäre erklärbar, wenn man bei der Kombination ALS mit Aspirin oder Trasylol annimmt, daß die immunsuppressive Wirkung von ALS durch diese Pharmaka gehemmt wird. Ein solches Experiment, d.h. die Inkubation von ALS mit Aspirin, Trasylol bzw. EDTA könnte man in vitro durchführen. Als Parameter für die Wirksamkeit von ALS vor und nach Inkubation mit diesen Pharmaka müßte der lymphozytotoxische Titer gemessen werden. Wenn sich aus diesem Experiment ergeben würde, daß der lymphozytotoxische Titer vermindert wird, wäre jedoch ein direkter Schluß von in vitro- auf in vivo-Verhältnisse nicht zulässig. Deswegen wurde auf das in vitro-Experiment verzichtet und das Transplantationsergebnis ohne Versuch einer schlüssigen Interpretation hingenommen.

Versucht man, die dargestellten Resorptionsergebnisse in einem klinischen Zusammenhang zu sehen, dann muß zunächst betont werden, daß auch große Mengen von oral zugeführtem Fremdeiweiß von den meisten Menschen vertragen werden. Nur relativ selten findet man Unverträglichkeitsreaktionen nach oral zugeführtem Fremdeiweiß. Auffällig ist dabei, daß diese Eiweißunverträglichkeit erst im Laufe des Lebens erworben worden ist und häufig im Zusammenhang steht mit länger verabreichten Medikamenten. Möglicherweise hat in diesen Fällen die Kombination von Medikament mit Fremdprotein zu einer stärkeren Resorption von großmolekularen Fremdproteinen geführt, welches dann den Patienten sensibilisiert hat. Offensichtlich bestehen bei der Resorption von Fremdproteinen Barrieren, die nur durch künstliche Maßnahmen durchbrochen werden können. Die Untersuchung anderer, in der Klinik häufig verwendeter Pharmaka, im Zusammenhang mit der Eiweißresorption würde möglicherweise eine ganze Reihe von Unverträglichkeitsreaktionen aufklären.

6. Zusammenfassung

Die Fragestellung in der vorliegenden Arbeit war, die Resorption von großmolekularen Fremdproteinen aus dem Magen-Darm-Trakt durch verschiedene Maßnahmen zu steigern. Dies sollte erreicht werden durch Dosissteigerung, durch Ausschalten der Bauchspeicheldrüsenenzyme auf mechanischem (Unterbindung des ductus pancreaticus) und pharmakologischem (EDTA, Trasylol, Aspirin) Wege. Durch diese Resorptionssteigerung sollte ein immunsuppressives, xenogenes Protein in verstärktem Maße durch die Darmwand resorbiert werden, um danach einen verlängernden Effekt auf Hauttransplantate zu entfalten. Dazu wurden an Ratten Resorptionsuntersuchungen und Transplantationsexperimente unternommen.

Die Steigerung der PGG-Dosis bewirkte eine Verminderung der Resorptionsrate (ca. 57 % bei 12,5 mg PGG; ca. 45 % bei 25 mg PGG; ca. 39 % bei 50 mg PGG), wie auch des großmolekularen Fremdproteinanteils nach der Darmwandpassage im Blut (ca. 7,3 % bei 12,5 mg PGG; ca. 5,4 % bei 25 mg PGG; ca. 3,1 % bei 50 mg PGG).

Die verminderte Enzymaktivität nach Unterbindung des ductus pancreaticus hatte zur Folge, daß zwar die Gesamt-resorptionsrate von 0,23 % (bei nicht unterbundenem ductus pancreaticus) auf 0,14 % (bei unterbundenem ducuts pancreaticus) absank, jedoch der Durchtritt von großmolekularen Fremdproteinen durch die Darmwand signifikant anstieg (3,41 % bei nicht unterbundenem ductus pancreaticus bzw. 8,11 % bei unterbundenem ductus pancreaticus).

Durch die pharmakologische Enzymhemmung mit EDTA und Trasylol wurden Resorptionsergebnisse erzielt, die denen nach mechanischer Unterbindung des ductus pancreaticus entsprechen. Ebenso hat Aspirin einen Einfluß auf die Resorption, wobei die Resorptionsrate von 67 % ohne Aspirin auf 33 % mit Aspirin vermindert wird, der großmolekulare Fremdproteinanteil im Blut jedoch von 7,4 % (ohne Aspirin) auf 9,1 % (mit Aspirin) steigt.

Obwohl oral verabreichtes ALS eine immunsuppressive Wirkung auf Hauttransplantate ausübt, läßt sich diese weder durch Dosissteigerung noch durch resorptionsfördernde pharmakologische Maßnahmen verbessern.

In der Diskussion werden darüber Vermutungen angestellt, ob die verwendeten Pharmaka die Wirksamkeit des ALS einschränken. Die klinische Bedeutung der Ergebnisse kann darin gesehen werden, daß möglicherweise therapeutische Pharmaka die Resorption von Fremdproteinen aus dem Darm begünstigen und damit Nahrungsmittelunverträglichkeiten induziert werden.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ABDU, I.A.,
REINHARDT, O.W., and
H. TRAVER: Plasma protein III. The
equilibrium between blood
and lymph protein,
J. Biol. Chem. 194, 15 (1952)
2. ARVANITAKIS, C,
G.-H. CHEN,
J. FOLSCRAFT, and
N.J. GREENBERGER: Effect of aspirin on intestinal
absorption of glucose, sodium,
and water in man,
GUT, 18, 187 - 190 (1977)
3. ASQUITH, P.,
JOHNSON, A.G., and
W.T. COOKE: Scanning electron microscopy of
normal and celiac jejunal mucosa,
Am. J. Diseases 15, 511 (1970)
4. BACHMANN, K., and
S.C. DEES: Milk allergy I. Observations on
incidence and symptoms in "well"
babies,
Pediatrics 20, 393 (1975)
5. BARRICK, R.H., and
R.S. FARR: The increased antibeef albumin in
the sera of allergic persons and
some comments regarding the
possible significance of this
occurrence,
J. Allergy 36, 374 (1965)
6. BAZIN, H.,
ANDRÉ, C., et
J.F. HEREMANS: Réponses immunologique induites
par voie orale,
Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)
124, 253 (1973)
7. BIENENSTOCK, J., and
J. DOLEZEL: Peyer's patches: lack of specific
antibody containing cells after
oral and parental immunization,
J. Immunol. 106, 938 (1971)

8. BORDET, J.: Ann. lust. Pasteur 12: 688 (1898)
9. BORDET, J.: Ann. lust. Pasteur 13: 225 (1899)
10. BRAMBELL, F.W.R.: The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunglobulins, Lancet II, 7473 (1966)
11. BRENDEL, W., und R.PICHLMAYR: Heterologe Antilymphozytenserum zur Immunsuppression bei Organtransplantationen, Dtsch. Med. Wschr. 92,549 (1967)
12. BRENDEL, W., und W. LAND: Überraschende Ergebnisse durch intravenöse Therapie mit Antilymphozytenserum bei Organtransplantationen, Dtsch. Med. Wschr. 93, 2309 (1968)
13. BRENDEL, W., LOB, G., et J. SEIFERT: Indications et résultats des SAL en dehors des transplantations rénales, In: Cours international de Transplantation Ed: Traeger Simep. Villeurbanne Lyon 1971
14. BRENDEL, W., und G.L. HABERLAND: Neue Aspekte der Trasyloltherapie, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York (1972)
15. BRENDEL, W., SEIFERT, J., and G. LOB: Effect of "Maximum Immune Suppression" with thoracic duct drainage, ALG, Azathioprine and Cortisone in some neurological disorders, Proc. Roy. Soc. Med. (London) 65, 531 (1972)

16. BUCKLEY, R.H., and
S.C. DEES: Correlation of milk precipitins
with IgA deficiency,
New Engl. J. Med. 281, 465 (1969)
17. CIONINI, L.,
BECCIOLINI, A.,
DALLA PALMA, L., and
G. de GIULI: Intestinal absorption of radio-
oidine labelled human serum albumin
monoidiotyrosine and di-idiotyrosine
following abdominal radiation
therapie,
Acta Radiol. 10, 341 (1971)
18. CODE, C.F.: Handbook of Physiology Sect.6 Vol.3
Am. Physiol. Soc. Wash. D.C. 1968
19. COOPER, G.N., and
K. TURNER: Immunological responses in rats
following antigenic stimulation of
Peyer's Patches
I. Characteristics of the primary
response,
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.
45, 363 (1967)
20. ECKHARDT, R.D.,
LEWIS, J.H.,
MURPHY, T.L.,
BATCHELOR, W.H., and
C.S. DAVIDSON: Chemical, clinical and immunological
studies on the products of human
plasma fractionation. XXXIV. Com-
parative studies on the nutritive
value of orally and intravenously
administered human serum albumin in
man,
J. chir. Invest. 27, 119 (1948)
21. FLEMSTRÖM, G.M.D., and
N.V.B. MARSDEN, M.D.: Dextran permeability, electrical
properties, and H^+ secretion in isolat-
ed frog gastric mucosa after acetylic-
salicylic acid,
Gastroenterologic 64: 278 - 284 (1973)
22. FODOR, L.: Rinderserum per os gegen Magen-
Darm-Atonie,
Münchn. Med. Wschr. 114, 292 (1972)

23. FRANKS, J.J.,
TAKEDA, V., and
E.B. REEVE: Preparation of autologous J-131-
albumin for metabolic studies in
man,
J. Lab. Clin. Med. 60, 619 (1962)
24. FRETER, R.: Detection of coproantibodies and
its formation after parenteral
and oral immunization of human
volunteers,
J. infect. Dis. 111, 37 (1962)
25. FREY, E.K.,
KRAUT, H., und
E. WERLE: Das Kallikrein-Kinin System und
seine Inhibitoren,
Enke, Stuttgart 1968
26. GANONG, W.F.: Medizinische Physiologie, Kurzge-
faßtes Lehrbuch der Physiologie
des Menschen für Studierende der
Medizin und Ärzte,
2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin-
Heidelberg-New York (1972)
27. HOLTER, H.: Pinocytosis,
Int. Rev. Cytol. 8, 481 (1959)
28. HUBER, R.,
RÜHLMANN, A., und
W. STEIGEMANN: In: Proc. of the International Re-
search Conference on Proteinase
Inhibitors,
München, Nov. 1970, S. 56,
De Gruyter, Berlin-New York (1971)
29. HUMPHREY, J.H., and
R.G. WHITE: Kurzes Lehrbuch der Immunologie,
2. Auflage G. Thieme Verlag Stgt (1971)
30. IHSE, I.,
ARNESJÖ, B., and
I. LUNDQUIST: The Effect of Peroral and Gastric
Trypsin Inhibitor Ingestion on the
Exocrine and Endocrine Pancreatic
Function in the Rat,
In: Kinogenases
Ed: G.L. Haberland and J.W. Rohen,
F.K. Schattauer Verlag Stuttgart-
New York (1973)

31. KUSCHINSKY, G., und
H. LÜLLMANN:
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie,
6. Auflage, Georg Thieme Verlag,
Stuttgart (1974)
32. LEAK, L.V.:
Lymphatic capillary ultrastructure
and permeability,
Europ. J. Physiol. Suppl. 366, 46
(1972)
33. McCAFFERY, T.D.,
KRAFT, S.C., and
R.M. ROTHBERG:
The influence of different techni-
ques in characterizing human anti-
bodies to cow's milk proteins,
Clin. exp. Immunol. 11, 225 (1972)
34. MITCHINSON, N.A.:
Induction of immunological paralysis
in two zones of dosage,
Proc. Roy. Soc. B 161, 275 (1964)
35. OUCHTELONY, O.:
Diffusion - in - gel methods for
immunological analysis II,
Progr. Allergy 6, 30 (1962)
36. RATNER, B., and
H.L. GRUEHL:
Passage of native proteins through
the normal gastrointestinal wall,
J. clin. Invest. 13, 517 (1934)
37. SCHLOSSMANN, A.:
Über die Giftwirkung des artfremden
Eiweißes in der Milch auf den Or-
ganismus des Säuglings,
Arch. Kinderheilkunde 41, 99 (1905)
38. SEIFERT, J.,
RING, J., and
W. BRENDDEL:
Prolongation of skin allografts
after oral application of ALS in
rats,
Reprinted from Nature, Vol. 249,
No. 5459, p. 776 (1974)
39. SEIFERT, J.,
RING, J., and
W. BRENDDEL:
The absorption of ALG from the gut
and its lymphocytopenic effect in
dogs,
Europ. Surg. Res. 6, Suppl. 1. 44
(1974)

40. SEIFERT, J.: Enterale Resorption großmolekularer Proteine bei Tieren und Menschen, Dr. Dietrich Steinkopf Verlag, Darmstadt, Supplementa zur Zeitschrift für Ernährungswissenschaft: Supplementum 18 (1976)
41. THOMAS, H.C., and D.M.V. PARROT: The induction of tolerance to a soluble protein antigen by oral administration, Immunology: accepted for publication
42. VOLKHEIMER, G., SCHULZ, F.H., and I. AURICH: Persorption of particles, Digestion 1, 78 (1968)
43. VOLKHEIMER, G., SCHULZ, F.H., LINDENAU, A., and U. BEITZ: Persorption of metallic iron particles, Gut 10, 32 (1969)
44. WALKER, W.A., ISSELBACHER, K.J., and K.J. BLOCH: Intestinal uptake of makromolekules: effect of oral immunization, Science 177, 608 (1972)
45. WALZER, M.: Studies in absorption of undigested proteins in human proteins I. a simple direct method of studying the absorption of undigested protein Immunology 14, 143 (1972)
46. WISEMAN, G.: Absorption of amino acids using an invitro technique, J. Physiol. (London) 120, 63 (1953)
47. WISEMAN, G.: Active transport of amino acids by sacs of small intestine of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) J. Physiol. (London) 133, 626 (1956)

LEBENS LAUF

30.6.1947 geboren in München
Vater: Dr. med. dent. Helmut Leu
Mutter: Helga Leu, geb. Ellerkamp

1953 - 1958 Besuch der Volksschule an der
Herterichstraße in München

1958 - 1968 Besuch des Klenze-Gymnasiums in München

22.7.1968 Reifeprüfung

1968 - 1972 Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-
Universität in München

1972 Beginn des Zahnmedizinstudiums

13.10.1972 Naturwissenschaftliche Vorprüfung

1973 Beginn des Medizinstudiums

16.6.1974 Zahnärztliche Vorprüfung

14.7.1977 Zahnärztliche Prüfung

28.7.1977 Bestallung als Zahnarzt

ab 1.10.1977 Verwalter einer wissenschaftlichen Assisten-
tenstelle an der Klinik für Zahn-, Mund- und
Kieferkrankheiten an der Ludwigs-Maximilians-
Universität in München

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. W. Brendel
bin ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes
an dem Institut für Chirurgische Forschung der
Universität München sowie für die allzeit freund-
liche Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. J. Seifert gilt mein
besonderer Dank für die Überlassung des Themas
und die stete Förderung und intensive Unterstützung
bei der Durchführung dieser Arbeit.

Eine besondere Hilfe waren für mich Frl. J. Krumbach
und Frl. S. Pfeffer durch ihren stets hilfreichen
und hervorragend technischen Beistand während der
Durchführung des experimentellen Teiles der Arbeit.

